

**Einfluss von n-3- versus n-6-basierten
Lipidemulsionen für die parenterale Ernährung
auf den Verlauf eines akuten Lungenversagens
der Maus**

Juliane Rose Ott



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

und

der Medizinischen Klinik II am Standort Gießen des
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Betreuer: PD Dr. Konstantin Mayer

Einfluss von n-3- versus n-6-basierten Lipidemulsionen für die parenterale Ernährung auf den Verlauf eines akuten Lungenversagens der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Juliane Rose Ott

Tierärztin aus Würzburg

Giessen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
Der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. M. Diener
PD Dr. K. Mayer

Tag der Disputation: 19. November 2008

**meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	10
1.1	Entzündungsreaktion bei einem akuten Lungenversagen.....	10
1.1.1	Pathophysiologie des akuten Lungenversagens.....	10
1.1.2	LPS-induzierte Signaltransduktion.....	11
1.1.3	Sequestration von Leukozyten.....	13
1.1.3.1	Rolling, Adhäsion, Transmigration.....	13
1.1.4	Permeabilität der Lungengefäße.....	16
1.1.5	Zytokinsynthese.....	18
1.1.6	Surfactantalteration.....	20
1.1.7	Ventilations-Perfusions-Regulation.....	20
1.2	Rolle von Lipiden in der Entzündung.....	22
1.2.1	Arachidonsäure.....	22
1.2.1.1	Metabolisierung von Arachidonsäure.....	23
1.2.2	Eicosapentaensäure, Docosahexaensäure.....	24
1.2.2.1	Metabolisierung von n-3-Fettsäuren.....	24
1.2.3	Eicosanoide.....	25
1.2.4	Plättchen-aktivierender Faktor (PAF).....	27
1.2.4.1	Plättchen-aktivierender Faktor.....	27
1.2.4.1.1	Struktur des PAF.....	27
1.2.4.1.2	Synthese und Abbau von PAF.....	28
1.2.4.1.3	Wirkung des PAF.....	30
1.2.4.2	Plättchen-aktivierender Faktor – Rezeptor.....	32
1.2.4.3	PAF-Rezeptor-Antagonist.....	35
1.3	Rolle von Lipidemulsionen in der parenteralen Ernährung.....	37
1.4	Fragestellung.....	41
2	Material und Methoden.....	42
2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	42
2.2	Geräte und Materialien.....	42
2.2.1	Materialien für die Tierhaltung.....	42
2.2.2	Geräte und Materialien für die <i>in-vivo</i> -Eingriffe.....	43
2.2.2.1	Geräte.....	43
2.2.2.2	Verbrauchsmaterialien.....	44
2.2.3	Geräte, Materialien und Chemikalien für die <i>in-vitro</i> -Bestimmungen.....	45
2.2.3.1	Geräte.....	45
2.2.3.2	Verbrauchsmaterialien.....	46
2.2.3.3	Chemikalien.....	47
2.3	<i>In-vivo</i> -Eingriffe.....	48
2.3.1	Anästhesie.....	48
2.3.2	Katheterimplantation.....	49
2.3.3	Wechsel der Infusionen.....	52
2.3.4	LPS-Instillation in die Trachea.....	53
2.3.5	Applikation des PAF-Rezeptor-Antagonisten.....	54
2.3.6	Blutentnahme.....	54
2.3.7	Broncho-alveoläre Lavage (BAL).....	54

Inhaltsverzeichnis

2.3.8	Organentnahme.....	55
2.4	<i>In-vitro</i> -Bestimmungen.....	55
2.4.1	Leukozyten-Zahl in der broncho-alveolären Lavage.....	55
2.4.2	Differenzierung der Leukozyten in der BAL.....	56
2.4.3	Leukozyten-Zahl im peripheren Blut.....	56
2.4.4	ELISA (TNF- α und MIP-2).....	56
2.4.5	Myeloperoxidase Aktivitäts-Assay.....	57
2.4.6	Proteinbestimmung in der BAL.....	58
2.4.7	Protokoll der Experimente.....	59
2.4.7.1	Gruppeneinteilung.....	59
2.4.7.2	Zeitverlauf.....	59
2.5	Statistik.....	60
3	Ergebnisse.....	61
3.1	Tierzahlen.....	61
3.2	Allgemeine Entzündungszeichen.....	61
3.2.1	Äußerlich sichtbare Krankheitsanzeichen.....	61
3.3	Leukozyteninvasion in die Lunge.....	61
3.3.1	Alveolarraum.....	62
3.3.1.1	Ergebnisse der Wildtyp-Mäuse.....	62
3.3.1.2	Ergebnisse der PAF-Rezeptor-Knock Out-Mäuse.....	67
3.3.1.3	Ergebnisse der WT plus PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021.....	68
3.3.2	Interstitium.....	72
3.3.2.1	Ergebnisse der WT.....	73
3.3.2.2	Ergebnisse der PAF-R-KO-Mäuse.....	74
3.3.2.3	Ergebnisse der WT plus PAF-RA BN 52021.....	76
3.3.3	Peripheres Blut.....	77
3.3.3.1	Ergebnisse der WT.....	78
3.3.3.2	Ergebnisse der PAF-R-KO-Mäuse.....	79
3.3.3.3	Ergebnisse der WT plus PAF-RA BN 52021.....	80
3.4	Permeabilität der endo- / epithelialen Barriere (" <i>vascular leakage</i> ") der Lungengefäße.....	81
3.4.1	Proteingehalt in der broncho-alveolären Lavage.....	81
3.4.1.1	Ergebnisse der WT.....	81
3.4.1.2	Ergebnisse der PAF-R-KO-Mäuse.....	84
3.4.1.3	Ergebnisse der WT plus PAF-RA BN 52021.....	86
3.5	Synthese pro-inflammatorischer Zytokine.....	90
3.5.1	Ergebnisse der WT-Mäuse.....	90
3.5.1.1	Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α).....	90
3.5.1.2	Makrophagen Inflammatorisches Protein - 2 (MIP-2).....	93
3.5.2	Ergebnisse der PAF-Rezeptor-Knock out-Mäuse.....	96
3.5.2.1	TNF- α	96
3.5.2.2	MIP-2.....	98
3.5.3	Ergebnisse der WT plus PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021.....	100
3.5.3.1	TNF- α	101
3.5.3.2	MIP-2.....	104

4	Diskussion.....	107
4.1	Auslösung eines akuten Lungenversagens im Mausmodell.....	107
4.1.1	Das LPS-induzierte akute Lungenversagen (ALI) in der Maus.....	107
4.1.2	Ergebnisse des LPS-induzierten ALI unter NaCl-Infusion im Vergleich	
4.1.3	zur unstimulierten Kontrolle.....	109
4.2	Beeinflussung des akuten Lungenversagens durch Lipidemulsionen...	110
4.2.1	Funktion von Lipidemulsionen in der parenteralen Ernährung.....	110
4.2.2	Auswirkungen der unterschiedlichen Lipidemulsionen auf eine akute	
	Lungenschädigung in der Maus.....	111
4.2.3	Modulation der Zytokin-Synthese durch Lipidemulsionen.....	114
4.2.4	Mechanismen der protektiven Wirkung der n-3-Lipide.....	116
4.3	Einfluss des PAF-Rezeptors auf die immun-modulatorische Wirkung	
4.4	der Lipidemulsionen im akuten Lungenversagen.....	117
4.4.1	Auswirkung des PAF-PAF-Rezeptor-Systems auf ein akutes Lungen-	
	versagen in der Maus.....	117
4.4.2	Wirkung von Lipidemulsionen auf die Entzündung in Abhängigkeit	
4.4.3	des PAF-PAF-Rezeptor-Systems.....	119
4.3.2.1	Mechanismen der Modulation der Lipid-abhängigen Effekte durch den	
	PAF-Rezeptor.....	120
4.4.4	PAF-PAF-Rezeptor-System und akutes Lungenversagen – Unterschiede	
	der Wirkung zwischen Mäusen und Menschen.....	121
4.3.3.1	PAF-PAF-Rezeptor-System als pharmakologische Intervention im	
	Menschen.....	121
4.5	Ausblick: Modulation einer Inflammation durch parenterale Ernährung -	
	klinische Anwendungsmöglichkeiten.....	122
5	Zusammenfassung.....	125
6	Summary.....	126
7	Literaturverzeichnis.....	127
8	Abbildungsverzeichnis.....	140
9	Danksagung.....	143
10	Erklärung.....	144

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ALI	<i>acute lung injury</i> = akutes Lungenversagen
AMP	Adenosinmonophosphat
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> = Schwere Form des akuten Lungenversagens
BAL	broncho-alveoläre Lavage
Balb/C	Labormaus-Inzuchtlinie
CD	<i>cluster of differentiation</i> = Oberflächenrezeptoren auf Leukozyten
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacylglycerol
DHA	Docosahexaensäure
E. coli	Escherischia coli
EET	Epoxyeicosatriensäure
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPA	Eicosapentaensäure
et al.	et alii
FO	Omegaven [®] (n-3-reiche Lipidemulsion)
g	Schwerkraft, Erdanziehungskraft
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
IE	internationale Einheiten
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal = in die Bauchhöhle
i.t.	intratracheal = in die Luftröhre
i.v.	intravenös = in die Vene
KG	Körpergewicht
Knock Out-Mäuse	Mäuse, denen ein Gen durch gentechnische Methoden ausgeschaltet wurde
LBP	Lipopolysaccharid – bindendes Protein

Abkürzungsverzeichnis

LCT	<i>long chain triglyceride</i> = langkettige Triglyzeride
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
LTA	Lipoteichonsäure
Lyso-PC	Lyso-Phosphatidylcholin
M	Molar = mol/l
M.	Musculus = Muskel
m CD14	membranständiges CD14
Mio	Million
MIP-2	Makrophagen Inflammatorisches Protein - 2
MPO	Myeloperoxidase
n	Anzahl in der Stichgruppe
n-3	omega-3
n-6	omega-6
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nukleärer Faktor-kappa B
OP	Operation
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAF-AH	Plättchen-aktivierender Faktor Acetylhydrolase
PAF-RA	Plättchen-aktivierender Faktor – Rezeptor Antagonist
PAF-Rezeptor KO	PAF-Rezeptor Knock Out = Deletion des Rezeptor-Gens
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> = Phosphatpuffer
PG	Prostaglandin
PI	Phosphatidylinositol
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
rpm	<i>rounds per minute</i>
s.c.	subkutan = unter die Haut

Abkürzungsverzeichnis

s CD14	lösliches CD 14
SO	Lipovenös 10% [®] (n-6-reiche Lipidemulsion)
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
Tx	Thromboxan
V.	vena = Vene
W/D	<i>wet/dry-ratio</i>
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Entzündungsreaktion bei einem akuten Lungenversagen

1.1.1 Pathophysiologie des akuten Lungenversagens

Das akute Lungenversagen („*Acute Lung Injury*“ = ALI oder die schwerere Form „*Acute Respiratory Distress Syndrom*“ = ARDS) wird definiert als „Syndrom einer Entzündung mit gesteigerter Permeabilität der Blutgefäße, das mit klinischen, radiologischen und physiologischen Abnormalitäten und höchstwahrscheinlich mit einem lungenkapillären Hochdruck einhergeht“ [Zhou et al. 2005]. Der Unterschied zwischen ALI und ARDS wird über den Oxygenierungsindex (P_{aO_2}/F_{iO_2}) definiert. Dieser zeigt das Verhältnis zwischen dem arterieller Sauerstoffpartialdruck (P_{aO_2}) und der inspiratorischen Sauerstoff-Konzentration (F_{iO_2}) an. Bei einem Oxygenierungsindex unter 300 mm Hg handelt es sich um ein „*acute lung injury*“, Werte unter 200 mm Hg weisen auf ein „*acute respiratory distress syndrom*“ hin. Die Erkrankung kann durch unterschiedliche Ursachen ausgelöst werden. Es werden pulmonale und extrapulmonale Ursachen unterschieden. Zu den pulmonalen Auslösern gehören die bakterielle oder virale Pneumonie, Lungenkontusion, Inhalationstrauma oder auch Beatmungstrauma. Bei den extrapulmonalen Gründen kann man z.B. die Sepsis, entzündliche Erkrankungen von Organen, Mehrfachverletzungen nach Unfällen oder die Folge eines operativen Eingriffes nennen [Bialy 2000].

Während der Entzündungsreaktion kommt es in der erkrankten Lunge zur Aktivierung von Leukozyten, Endothelzellen und Epithelzellen. Dies führt unter anderem zu einer Migration von Leukozyten aus dem Gefäßbett in das umliegende Gewebe. Die Folge ist nicht nur eine Ansammlung von Leukozyten im Interstitium und im Alveolarraum, dazu kommt auch eine Akkumulation von Leukozyten in der kapillären Strombahn der Lunge [Andonegui et al. 2003]. Ausgelöst wird dies durch eine Veränderung in den Endothelzellen der Lungenkapillaren und durch eine steigende Rigidität der aktivierten Leukozyten.

Es kommt zu fortschreitenden Reaktionen und dadurch zu Folgeschäden in der betroffenen Lunge. Daraus resultieren z.B. Flüssigkeitsansammlungen in den Alveolen, Atelektasen der betroffenen Gebiete, Vasokonstriktion, Surfactantmangel und diffuse alveoläre Infiltrate. Auch ein pulmonaler Hochdruck kann als Folge entstehen. Am Ende des ARDS kann eine Perpetuierung der Entzündung zu einem ausgeprägten Lungenversagen und einer Lungenfibrose führen.

Das akute Lungenversagen stellt eine schwerwiegende Komplikation einer Lungenentzündung mit hoher Sterblichkeit dar. So erkrankten in Deutschland jährlich ca. 3,5 – 4,5/100000 Menschen an einer schweren ARDS, wobei die Letalität bei 40–50 % liegt [Esteban et al. 2002].

1.1.2 LPS-induzierte Signaltransduktion

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Wandbestandteil gram-negativer Bakterien und wird auf Grund seiner Funktion als Endotoxin bezeichnet. Es besteht aus einem Lipidteil, dem Lipid A und Polysaccharid-Seitenketten. Die Lipid A-Struktur ist für die immunologische Funktion verantwortlich und bei fast allen gram-negativen Bakterien identisch. Die Seitenketten können zwischen den verschiedenen gram-negativen Bakterien stark variieren. Die Gabe des purifizierten Toxins in einen Organismus hat eine regelhafte Sequenz von Abläufen zur Folge [Christman et al. 1990].

LPS wird im Organismus an ein spezifisches Protein gebunden, das LPS-bindendes Protein (LBP) genannt wird [Schumann et al. 1994; Wright et al. 1990]. Dieses LBP wird als Akute-Phase-Protein von der Leber gebildet und hat eine Verstärkung der LPS-Wirkung zur Folge [Schumann 1992].

Über CD14, dem LPS spezifischen Oberflächenrezeptor, kommt es zum Andocken des LPS-LBP-Komplexes an die Zelle (Abb. 1). CD14 ist ein Glykoprotein, das als Oberflächenrezeptor fungiert und sich auf der Zelloberfläche reifer Leukozyten befindet [Goyert et al. 1986]. Es spielt eine wichtige Rolle bei der LPS-induzierten Zellantwort und kommt auf Monozyten, Makrophagen, aber auch neutrophilen Granulozyten vor [Wright et al. 1990]. Das membrangebundene CD14 (m CD14) ist in der Zellmembran verankert und verbindet sich nach Aktivierung mit dem Toll-like-Rezeptor-4 (TLR4) [Haziot et al. 1988].

Der TLR4 ist der vorherrschende, dominante Rezeptor für die durch LPS ausgelösten Effekte [Andonegui et al. 2003]. An diesen bindet der LPS-LBP/CD14-Komplex und löst weitere Signale aus. Über MyD88, das „*myeloid differentiation primary response gene (88)*“, werden nun weitere Kinasen aktiviert. Daraufhin wird die Aktivierung der Interleukin-1 Rezeptor–assozierten Kinase (IRAK) induziert. Diese wiederum aktiviert den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF 6). Die Kinasen phosphorylieren den Inhibitor ($I\kappa B$) des Nukleären Faktors- κB (NF- κB). Es kommt zu einer Abspaltung des Inhibitor-Komplexes und dadurch zur Aktivierung des pro-inflammatorischen wirkenden Nukleärer Faktor (NF)- κB . Jetzt erfolgt eine Translokation von NF- κB aus dem Zytosol in den Zellkern, wo die Transkription von Zielgenen initiiert wird. Dabei spielt NF- κB eine Schlüsselrolle in der Genexpression von pro-inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen, wie z.B. TNF- α oder Interleukin (IL)-8 [Han et al. 2002; Poynter et al. 2003]

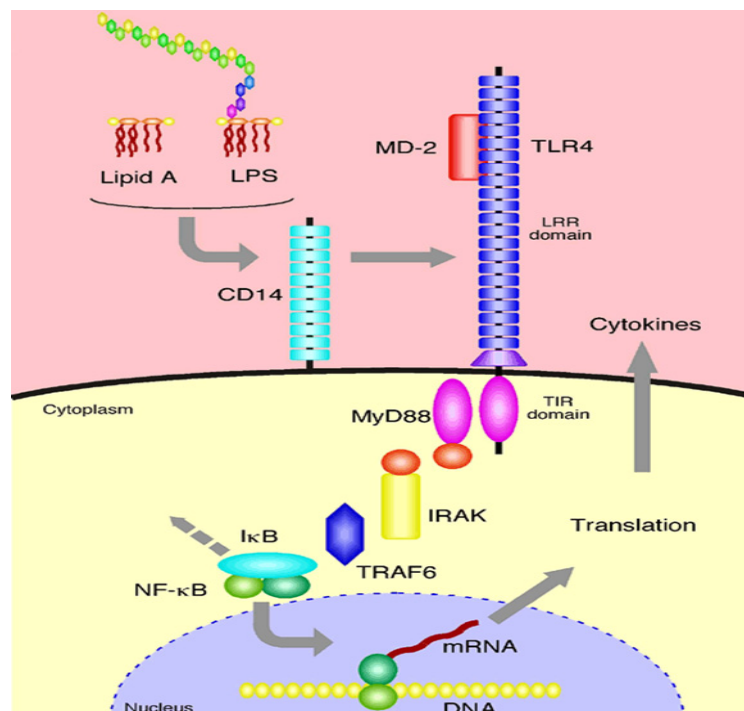


Abbildung 1: Signalweg des Lipopolysaccharides

Die Lipid A-Struktur des LPS bindet an LBP und bildet einen Komplex. Dieser Komplex koppelt an CD14, den Rezeptor für bakterielles Endotoxin, und diese Verbindung interagiert mit dem TLR4. Die Signaltransduktion geht nun über MyD88, IRAK und TRAF6 zur Phosphorylierung von $I\kappa B$ und somit zu einer Aktivierung von NF- κB . Dieser transloziert in den Zellkern und löst letztendlich die Synthese von pro-inflammatorischen Mediatoren aus. (Darstellung erstellt von „GlycoWord“)

Membranständiges CD14 kann nach LPS/LBP-Kontakt von der Zelloberfläche abgelöst werden. Dieser Vorgang wird auch „*shedding*“ genannt. Er führt zu einem Anstieg von löslichem CD14 (s CD14) im Blut. Dieses Abstoßen wird durch Überstimulation pro-inflammatorischer Mediatoren (TNF- α) ausgelöst und wird als negative Regulierung des LPS-Rezeptors m CD14 interpretiert [Bazil and Strominger 1991]. S CD14 bindet freie Endotoxine und kann so die zellulären und pro-inflammatorischen LPS-induzierten Effekte verhindern [Schumann 1992]. Andererseits ist an isolierten Endothelzellen, die keinen m CD14-Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren, nachgewiesen worden, dass die direkte Endotoxinwirkung über das s CD14 des Serums vermittelt wird [Frey et al. 1992; Schumann et al. 1994]. S CD14 übernimmt dabei die Funktion des membranständigen CD14 und transportiert das LPS zur Endothelzelle. So kommt es unter anderem über die oben dargestellte Signaltransduktionskaskade zur Aktivierung von NF- κ B und somit zu einer Exprimierung von Adhäsionsmolekülen, zur Synthese von Chemokinen und Zytokinen, sowie zur Generierung des Vasodilatators Stickstoffoxid (NO).

1.1.3 Sequestration von Leukozyten

1.1.3.1 Rollen, Adhäsion, Transmigration

Das Auswandern der Leukozyten aus dem Blutgefäßbett in das entzündete Gewebe ist ein wichtiger Schritt für die Bekämpfung einer Infektion (Abb. 2). Dabei sind das Rollen, oder auch „*rolling*“ genannt, die Adhäsion und die Transmigration der Leukozyten die entscheidenden Vorgänge, die es ihnen ermöglichen, in das Gewebe zu gelangen [Weyrich et al. 1995]. Rollen ist ein Vorgang, bei dem die Leukozyten an der Gefäßwand entlangrollen und immer langsamer werden. In der Adhäsionsphase kommt es dann zu einer festen Bindung zwischen Leukozyten und Endothelzellen. In der anschließenden Transmigration wandern die Leukozyten ins umliegende Gewebe aus.

Endotoxin (LPS) führt zu einer Aktivierung dieser Vorgänge auf den Leukozyten und den Endothelzellen.

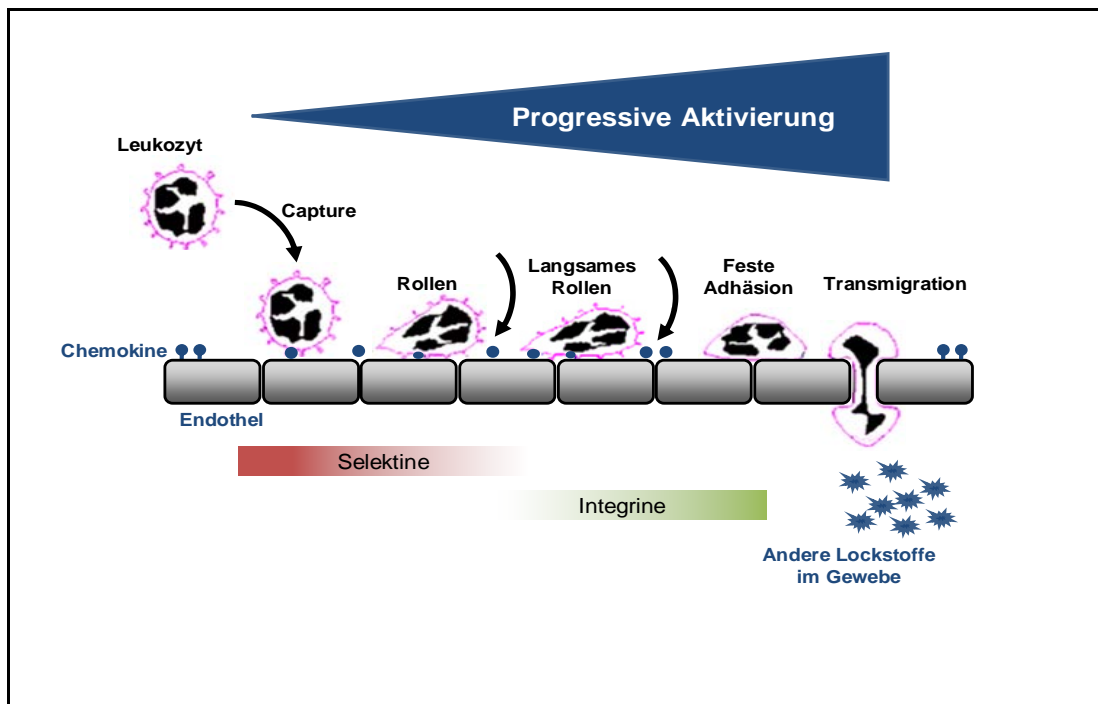


Abbildung 2: Rollen, Adhäsion und Transmigration der Leukozyten

Ausgelöst durch einen Stimulus werden die Endothelzellen und auch die Leukozyten aktiviert. Dadurch werden verschiedene Adhäsionsmoleküle sowohl auf den Leukozyten als auch auf den Endothelzellen ausgebildet. Die Leukozyten beginnen mit der Gefäßwand in Kontakt zu treten und entlang dieser zu rollen. Dieses Rollen wird immer langsamer, bis es zu einer festen Adhärenz kommt und die Leukozyten mit Hilfe verschiedener Moleküle durch die Gefäßwand in das Interstitium gelangen (Darstellung erstellt von der Universität Helsinki, Finnland).

Durch einen Endotoxin-Stimulus kommt es neben der Synthese des Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α auch zur Bildung des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF). LPS und TNF- α führen zu einer Steigerung der Adhärenz von Leukozyten an Endothelzellen, wodurch es zu einem stärkeren Rollen und einer vermehrten Adhäsion kommt. Zusätzlich zu diesen Faktoren hat ein endothelial synthetisierter und den Leukozyten präsentierter PAF zur Folge, dass die Adhäsionsmoleküle der Leukozyten in einen aktivierten Zustand überführt werden [Zimmerman et al. 2002].

Adhäsionsmoleküle sind Proteine der Zelloberfläche, die für diese Vorgänge wichtig sind. Sie lassen sich in drei unterschiedliche Gruppen gliedern [Patarroyo 1994].

1) Die erste Gruppe ist die Gruppe der Selektine. Hierbei werden E (Endothel-) Selektin (CD62E) und P (Plättchen- und Endothel-) Selektin (CD62P) auf dem

aktivierten Endothel exprimiert (Abb. 3). P-Selektin wird z.B. aus den Weibel-Palade-Bodies der Endothelzellen mobilisiert und ist nach TNF- α Stimulation maximal exprimiert. Die L (Leukozyten-)-Selektine (CD62L) sind auf der Zellmembran der Leukozyten lokalisiert. Des Weiteren besitzen Monozyten das P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PGL-1), mit dem sie zusätzlich an die Selektine des Endothels binden können [Tedder et al. 1995]. Damit sind die Monozyten in der Lage, an Selektine des Endothels zu binden, und gehen vom Fließen im Blutstrom zum langsameren Rollen entlang der Endotheloberfläche über [Konstantopoulos and McIntire 1996].

2) Die zweite Gruppe der Adhäsionsmoleküle bilden die Integrine. Integrine sind Heterodimere, bestehen aus zwei miteinander assoziierten Glykoprotein-Ketten: einer Alpha- und einer Beta-Kette. Auf den Leukozyten werden β 1- und β 2-Integrine exprimiert. Integrine können an die dritte Gruppe der Adhäsionsmoleküle, die Immunglobulin-ähnlichen Glykoprotein-Moleküle binden.

3) Diese Immunglobulin-ähnlichen Glykoprotein-Moleküle werden membranständig auf dem Endothel exprimiert. Dabei werden zuerst die endo- und epithelial-ständigen VCAMs (*vascular cell adhesion molecule*, VCAM-1, CD106) ausgebildet. Diese Moleküle können an ihre korrespondierenden Integrine auf der Leukozytenoberfläche binden. Im weiteren Verlauf kommt es so zu einer so genannten „*firm adhesion*“. Dabei haften die Leukozyten fest an der Oberfläche der Gefäßendothelien. Der Ligand Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) und sein Rezeptor nimmt bei diesem Vorgang eine zentrale Rolle ein. PAF wird durch Endothelzellen nach Aktivierung sowohl membranständig exprimiert als auch sezerniert. Der PAF-Rezeptor ist hingegen auf den Leukozyten membranständig lokalisiert. Durch Bindung des Liganden an seinen Rezeptor kann eine interzelluläre Adhäsion ermöglicht werden [Zimmerman et al. 1997]. Zusätzlich kommt es zu einer Steigerung der Affinität zwischen den leukozytären β 2-Integrinen und den endothelialen ICAMs, wodurch die Adhäsion der Leukozyten an der Endothelmembran verstärkt wird („*firm adhesion*“) [Lorant et al. 1991; Prescott et al. 1984]. Durch diesen Prozess der „*firm adhesion*“ und von stimulierten Zellen sezernierte Zytokine kommt es zu einer Expressionssteigerung der ICAMs (*Intercellular-adhesion molecule-1*, CD54 und ICAM-2, CD102), die bereits konstitutiv von den Endothelzellen exprimiert werden [Grimminger 1994]. Die folgende Transmigration der Leukozyten durch die interendothelialen Zelljunctionen wird hauptsächlich durch die Bindung von β 2-

Integrinen an die endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und PECAM-1 (*Platelet-Endothelial Cell adhesion molecule*, CD31) ermöglicht [Luscinskas et al. 1996]. Diese Interaktionen führen letztlich zu einer Transmigration der Leukozyten aus dem intravasalen Blutstrom in das Interstitium.

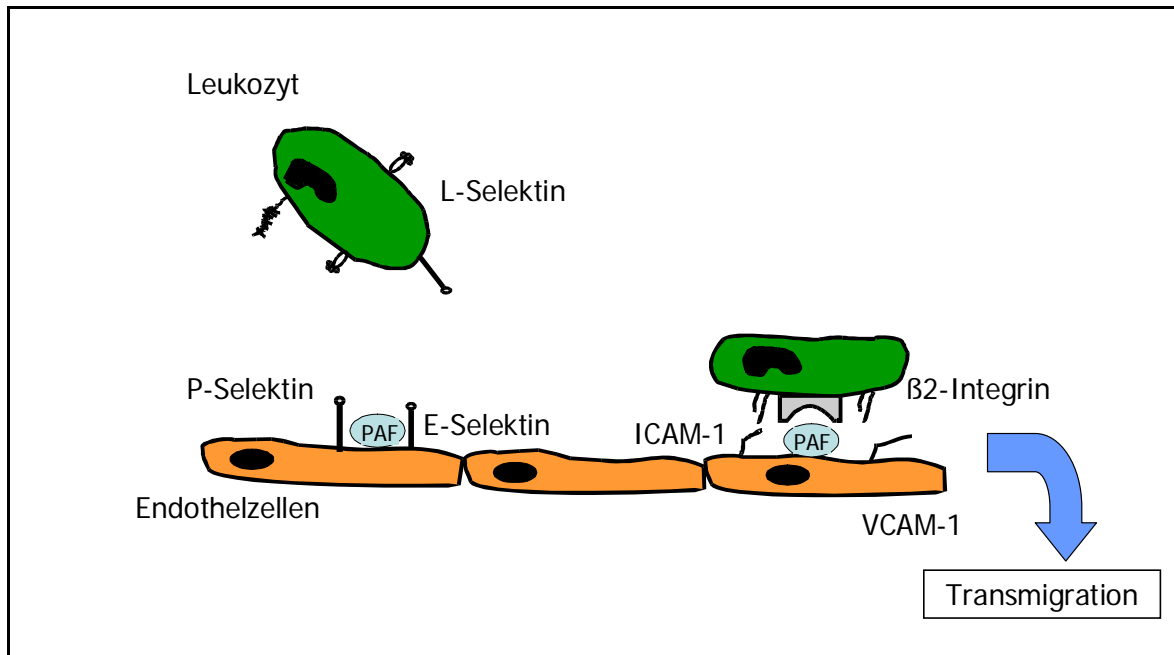


Abbildung 3: Einfluss der Adhäsionsmoleküle auf Rollen, Adhäsion und Transmigration der Leukozyten

Durch Stimulierung der Endothelzellen werden P- und E-Selektine sowie PAF exprimiert. Auf Seite der Leukozyten werden L-Selektine exprimiert. Aufgrund der Bindung der L-Selektine an die P- und E-Selektine kommt es zu einem langsamen Rollen der Leukozyten entlang der Blutgefäßwand. Durch Expressierung der Integrine geht das Rollen in eine feste Bindung über. Die Bindung von $\beta 2$ -Integrinen an die endothelialen Adhäsionsmoleküle VCAM- und ICAM-Moleküle ermöglicht die Transmigration der Leukozyten durch die endotheliale Barriere in das Interstitium.

1.1.4 Permeabilität der Lungengefäße

Im Körper wird der Flüssigkeitsaustausch zwischen den Gefäßen, dem Interstitium und dem Lymphsystem über transvaskuläre Gradienten für den hydrostatischen und kolloidosmotischen Druck reguliert. Unter physiologischen Bedingungen besteht zwischen der im arteriellen Kapillarschenkel in das Interstitium filtrierten und der im venösen Kapillarschenkel sowie im Lymphsystem reabsorbierten Flüssigkeit ein

Gleichgewicht. Neben dem transvaskulären Druckgradienten bildet die Endothelmembran eine weitere regulierende Barriere für den Flüssigkeitsaustausch zwischen dem Intravasalvolumen und dem interstitiellen Flüssigkeitsvolumen. Bei intakter Barriere wird die Flüssigkeitsfiltration und –reabsorption ausschließlich über die beschriebenen Druckgradienten reguliert. Die so erreichte Homöostase kann durch eine gesteigerte Kapillarpermeabilität, ausgelöst durch z.B. inflammatorische Mediatoren, gestört werden. Eine vermehrte Filtration in das Interstitium mit folgender Ödembildung ist die Folge [Aukland and Reed 1993; Parker 1984]. Dabei handelt es sich um ein eiweißreiches Ödem, welches auch in die Alveolen übertreten kann. Diese Flüssigkeitsansammlung führt zu einer Gasaustauschstörung. Das Surfactant, welches in den alveolären Flüssigkeitsfilm sezerniert wird und dort ein Herabsetzen der Oberflächenspannung der Alveolen bewirkt, wird durch das eiweißreiche Transsudat inaktiviert. Zudem kommt es zu einer vaskulären Dysfunktion mit akuter Widerstandserhöhung in der pulmonalen Strombahn. Ein solcher Prozess kommt z.B. bei einer akuten oder chronischen pulmonalen Hypertension (Lungenhochdruck) oder bei einer akuten Lungenschädigung, z.B. durch pulmonale Inflammation, vor [Parker and Townsley 2004].

Bei der Anpassung der Ventilation, der Belüftung der Lunge, an die Perfusion, die Durchblutung des Organs, unter inflammatorischen Bedingungen spielen von der Arachidonsäure abgeleitete Prostanoiden eine wichtige Rolle, da sie antagonistisch (Thromboxan A_2 / Prostaglandin I_2) an der Vasomotorik beteiligt sind, und ihre Bildung unter inflammatorischen Bedingungen gesteigert werden kann. Somit kann die empfindliche Balance der Anpassung der Ventilation an die Perfusion gestört werden [Walrmath et al. 1996; Walrmath et al. 1993].

So wirkt PGI_2 (Prostazyklin) in vielen Gefäßgebieten vasodilatierend. Dadurch verlangsamt sich der Blutfluss; dies erleichtert die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten und erhöht so die Permeabilität des Endothels mit folgender Ödembildung.

Thromboxan A_2 wirkt einerseits vasokonstriktorisches, erhöht andererseits jedoch auch die vaskuläre Permeabilität und steigert folglich ebenfalls die Ödembildung. Darüber hinaus aktiviert es Leukozyten und leitet sie mittels chemotaktischer Signale an den Ort der Entzündung [Seeger and Lasch 1987; Seeger and Suttorp 1987].

1.1.5 Zytokinsynthese

Zytokine und Chemokine sind Botenstoffe, die von aktivierten Zellen im Falle einer Entzündung sezerniert werden. Sie vermitteln die Antwort des Immunsystems auf den Entzündungsstimulus.

Zu diesen Zellen gehören unter anderem auch die Monozyten und Alveolarmakrophagen. Alveolarmakrophagen befinden sich in den Alveolen und sind monozytärer Herkunft. Sie phagozytieren aerogen aufgenommenes oder örtlich freigesetztes Material und sind die initialen Aktivatoren der Entzündungskaskade [Tonks et al. 2003]. Monozyten transmigrieren bei Auslösung eines Lungenversagens verstärkt in die Alveolen. Nach Aktivierung der Monozyten durch beispielsweise LPS sezernieren diese Zytokine, wie den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α . Daraufhin initiiert dieser dann selbst die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine, wie z.B. Interleukin-1 β (IL-1 β) oder IL-6 und wirkt somit als essentieller Mediator der klinischen Symptome einer Endotoxämie [Baxter 1997; Damas et al. 1989; Engelberts et al. 1992; Vincent and Bihari 1992]. TNF- α ist zunächst membranständig auf Monozyten (memTNF) lokalisiert. Dann wird die extrazelluläre Fraktion durch das TNF- α -converting enzyme (TACE) abgespalten, und eine lösliche Form entsteht (solTNF- α) [O'Dea et al. 2005]. MemTNF- α wirkt aber auch als Zell-zu-Zell-Botenstoff. SolTNF- α wirkt hauptsächlich parakrin auf benachbarte Zellen [Mohler et al. 1994; Pellegrini et al. 1996]. TNF- α selbst bewirkt Symptome wie Fieber, Tachykardie, Hyperventilation und Gefäßerweiterung [Beasley et al. 1989] und verursacht die Synthese weiterer pro-inflammatorischer Zytokine. Dies geschieht über Bindung des TNF-Trimers an den TNF-Rezeptor 2. In Studien wurde gezeigt, dass die Enden, die für die Rezeptorbindung und biologische Aktivität wichtig sind, in den Untereinheiten des TNF-Trimers lokalisiert sind [Van Ostade et al. 1994; Yamagishi et al. 1990].

Für die Bindung des Zytokins TNF- α stehen zwei unterschiedliche Rezeptoren zur Verfügung. Bei Bindung an den TNF-Rezeptor 2 (TNFR2) kommt es zur Aktivierung des TNF-Rezeptor-assoziierten Faktors 2 („TNF-R-associated factor 2“ - TRAF2). Daraufhin werden Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen in Gang gesetzt. Am Ende dieses Prozesses steht die Aktivierung der c-Jun NH2-terminal Kinase (JNK), die c-Jun phosphoryliert und somit deren Transkriptionsaktivität erhöht.

Letztendlich kommt es zur Phosphorylierung des I κ B-Proteins und als Folge dessen zur Aktivierung des NF- κ B. Dadurch wird die Transkriptionsrate pro-inflammatorischer Mediatoren erhöht [Chen and Goeddel 2002].

Bei Bindung an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) wird die TNF-Rezeptor assoziierte Todesdomäne („*TNF-receptor asociated death domain*“ – TRADD) aktiviert. Daraus resultierend wird der TNF-Rezeptor–assoziierte Faktor 2 („*TNF-R-associated factor 2*“ – TRAF2) und die Fas-assoziierte Todesdomäne („*Fas-asociated death domain*“ – FADD) aktiviert. Letztendlich wird die Apoptose der Zelle über die Phosphorylierung unterschiedlicher Kaspasen ausgelöst.

TNF- α stimuliert über die Ausschüttung von IL-1 β fast alle kernhaltigen Leukozyten, induziert die Bildung von IL-6 aus den Zellen des Immunsystems (aktivierte Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen) und wirkt mit IL-6 synergistisch als Aktivator einiger Akut-Phase-Proteine und der Komplementkaskade [Bone 1996]. An dem Endothel fördert TNF- α zusammen mit IL-6 die Adhärenz von Granulozyten [Palluy et al. 1992] und damit die Diapedese von weiteren Leukozyten in das Entzündungsgebiet.

Interleukin-6 wird von den Zellen des Immunsystems sezerniert [Heinrich et al. 1990] und wirkt auf alle peripheren Zielzellen (B-Zellen, Hepatozyten, Fibroblasten) pro-inflammatorisch [Damas et al. 1989; Steinmetz et al. 1995]. Darüber hinaus steigert es die Expression von Adhäsionsmolekülen [Shong et al. 1994], und die Ausschüttung von Corticotropin-releasing Hormon (CRH), welches, vermittelt über das Adreno-Corticotrope Hormon (ACTH), in der Nebennierenrinde die Cortisolsynthese und -sezernierung steigert. Cortisol bewirkt eine negative Rückkopplung auf IL-6 über eine Hemmung der Produktion von IL-6 aus Monozyten und Fibroblasten [Heinrich et al. 1990; Taylor et al. 1997].

Das murine Makrophagen Inflammatorische Protein-2 (MIP-2) entspricht dem humanen Interleukin 8. MIP-2 bzw. IL-8 sind Chemokine der CxC-Familie und werden nach Induktion durch Interleukin-1 β unter anderem von Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten produziert. Chemokine sind Proteine, denen eine wichtige Rolle in physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen sowie in akuten und chronischen Entzündungsprozessen zukommt. Die Sequenzen der Chemokine weisen untereinander hohe Homologien auf und sind durch 4-Cystein-

Motive charakterisiert. Diese Struktur spiegelt sich in der Nomenklatur dieser Proteinfamilie wieder: Die ersten zwei Cystein-Reste sind durch eine einzelne Aminosäure verbunden (C-x-C).

Die wesentliche biologische Wirkung von MIP-2/IL-8 ist die Förderung der Chemotaxis, die Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen sowie die Aktivierung und Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Aufgrund dieser Funktionen sind die wichtigsten Zielzellen dieser Chemokine die neutrophilen Granulozyten [Wolpe et al. 1989].

1.1.6 Surfactantalteration

Surfactant ist ein von Alveolarepithelzellen Typ II sezerniertes lecithinhaltiges, an Globuline gebundenes Phospholipid. Das Surfactant leitet sich aus den Wörtern „*surface active agent*“ ab und stellt eine oberflächenaktive Substanz dar, die das Alveolarepithel von innen in Form eines feinen Films überzieht und die Oberflächenspannung der Lungenalveolen herabsetzt. Dadurch verringert sich insbesondere in der Expirationsphase die Wirkung der Oberflächenspannung auf die Lungenmechanik. Dies wirkt der Entstehung von Atelektasen entgegen.

Schädigungen des Surfactant-Systems können beispielsweise durch ein alveoläres Lungenödem ausgelöst werden. Durch die pathologisch gesteigerte Permeabilität der Endothelzellen, bedingt durch die Störung der alveolären-kapillären Barriere, kommt es zu einem Einstrom von eiweißreicher Flüssigkeit in den Lungenalveolen. Dies führt einerseits zum Absterben von Alveolarepithelzellen Typ II und somit zu einer geringeren Produktion von Surfactant [Groeneveld 2002; Verbrugge et al. 1997], andererseits kommt es durch die einströmende Flüssigkeit zu einer Verdünnung der Surfactant-Konzentration in der Alveolarepithelzellflüssigkeit. Zusätzlich können Gerinnungsfaktoren die Wirkung des Surfactant stören.

1.1.7 Anpassung von Ventilation und Perfusion

Der Gasaustausch zwischen dem Luftraum und dem Blutstrom des Organismus stellt die Hauptfunktion der Lunge dar. Drei Teilprozesse lassen sich dabei abgrenzen:

1. Die Ventilation transportiert während der Inspiration sauerstoffreiche Luft in die Lunge und entfernt während der Expiration das kohlendioxidreiche Gasgemisch aus den Gasaustauschräumen und Atemwegen.
2. Während der anschließenden Diffusion kommt es zu dem eigentlichen Atemgasaustausch zwischen dem Alveolarraum und dem Blutstrom der Alveolarkapillaren. Sauerstoff diffundiert über die Alveolarepithel- und Endothelmembran in den Blutstrom. Gleichzeitig diffundiert Kohlendioxid dem entgegengesetzten Gradienten folgend aus dem Blutstrom in den Alveolarraum.
3. Die Durchblutung (Perfusion) der Lungenkapillaren stellt eine weitere regulierende Größe dar, da die Diffusion neben den Gas-Partialdrücken auch von der Geschwindigkeit und dem Volumen des Blutstromes abhängig ist. In Ruhe werden 50% der Lungenkapillaren durchblutet. Bei steigender Belastung steigt die Anzahl der durchbluteten Gefäße an, Reservekapillaren werden durch Dilatation der arteriellen Lungengefäßäste geöffnet. Im Gegensatz dazu werden bei einem niedrigen alveolären Sauerstoff-Partialdruck, verursacht durch eine geringere Ventilation, die entsprechenden präkapillären Pulmonalarterienäste kontrahiert. Durch diese hypoxiebedingte Vasokonstriktion wird der pulmonale Blutfluss der alveolären Ventilation angepasst. Während einer Entzündungsreaktion kann diese Anpassung von Ventilation und Perfusion gestört sein. Es kommt durch Entzündungsmediatoren, wie z.B. PAF, Leukotrien C₄ (LTC₄), Thromboxan A₂ (TxA₂) oder auch Sauerstoffradikale, zu einer vaskulären Dysfunktion [Held et al. 1999]. Dies führt zu einer gesteigerten Permeabilität der Lungenkapillaren, zusammen mit einer Anhäufung von Flüssigkeit und Proteinen sowohl im Interstitium als auch in den Alveolen. Zudem wird das Immigrieren von Leukozyten gefördert. Diese Entzündungsmerkmale führen neben einer Störung der Vasomotorik zu einer Störung in der Ventilation durch protein- und zellreiche Flüssigkeit in den Alveolen. Auch die Diffusion ist durch die Verdickung des Interstitiums gestört. Des Weiteren führen unterschiedliche inflammatorische Mediatoren zu einer Dysregulation der Perfusion. Die Folge ist ein Ventilations-Perfusions-Missverhältnis [Weissmann et al. 2005].

1.2 Rolle von Lipiden in der Entzündung

Lipide besitzen eine immun-modulatorische Wirkung. So ist z.B. ein anti-inflammatorischer Effekt der n-3-Fettsäuren („Fischfettsäuren“, gewonnen aus Kaltwasser-Fischen: Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA)) in experimentellen und klinischen Studien nachgewiesen worden. Im Vergleich dazu wurde eine Verstärkung der Entzündungsparameter durch die n-6 Fettsäure Arachidonsäure erreicht. Die Wirkung der n-3 Fettsäuren liegt in der Konkurrenz mit der Arachidonsäure um die Verstoffwechselung durch gleiche Enzymsysteme [Calder 2006; Fritsche 2006; Gadek et al. 1999; Heller et al. 2006; Mayer et al. 2003b].

1.2.1 Arachidonsäure

Arachidonsäure (AA) ist eine ungesättigte Fettsäure, die aus 20 Kohlenstoffatomen und vier Doppelbindungen besteht (Abb. 4). Die letzte dieser Doppelbindungen liegt sechs Kohlenstoffatome vom Methylende entfernt. Deshalb wird sie auch als n-6-Fettsäure bezeichnet. Man kann diese Fettsäure auch mittels ihrer Strukturformel C20:4:6 beschreiben.

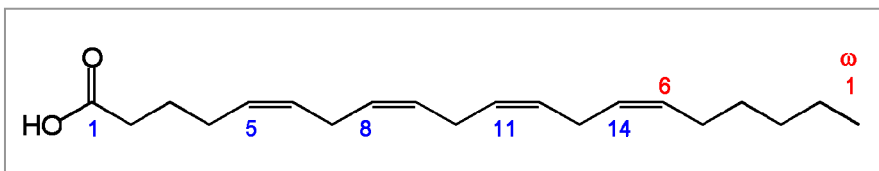


Abbildung 4: Strukturformel Arachidonsäure

Damit Arachidonsäure metabolisiert werden kann, muss sie entweder frei im Blutplasma vorliegen oder aus der Zellmembran herausgelöst werden. Diesen Vorgang übernimmt die Phospholipase A₂, welche die mittlere Esterbindung der Membranphospholipide (C₂-Position) spaltet, an der Stelle, an welcher sich in der Regel die ungesättigte Fettsäure befindet.

1.2.1.1 Metabolisierung von Arachidonsäure

Die Arachidonsäure wird über die Cyclooxygenase, die Lipoxygenase und den Cytochrom P450-Weg metabolisiert. Die daraus entstehenden Stoffwechselprodukte sind die Eicosanoide.

Die durch die Cyclooxygenase verstoffwechselten Metaboliten sind die Prostaglandine (PG) und das Thromboxan (Tx). Die Lipoxygenase katalysiert die Bildung der Leukotriene (LT) und der Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEs); und über den Cytochrom P450 abhängigen Signaltransduktionsweg entstehen die Epoxyeicosatriensäuren (EET).

Nach Freisetzung der AA aus verschiedenen Membranphospholipiden durch die Phospholipase A₂ beginnt die Synthese der Prostaglandine und des Thromboxan A₂. Die Cyclooxygenase, die sich frei im Zytosol befindet, katalysiert eine Bis-Dioxygenierung des Substrates Arachidonsäure über das Zwischenprodukt PGG₂ zu dem Endoperoxid PGH₂. Dieses Produkt nimmt eine zentrale Stellung in der Prostaglandinsynthese ein, da es als Ausgangssubstanz für weitere Prostaglandine dient.

Im Gegensatz zur ubiquitären Cyclooxygenase, die je nach Isoform ständig aktiv oder durch einen Reiz aktiviert wird, ist das Enzym Lipoxygenase nur in myeloiden Zellen vorhanden. Es benötigt darüber hinaus stets einen Stimulus, um seine Produkte zu synthetisieren. Über die 5-Lipoxygenase (5-LOX) wird das instabile Hydroperoxid 5-HPETE (5-Hydroxyperoxyeicostetraensäure) gebildet. Dies kann nun durch eine Hydroperoxidase in 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) umgewandelt werden.

In einem weiteren Schritt entsteht aus 5-HPETE durch die LTA₄-Synthetase das sehr instabile Zwischenprodukt Leukotrien (LT) A₄. Dieses zerfällt spontan, kann aber auch enzymatisch entweder in Cysteinyl-Leukotriene oder LTB₄, je nach Enzymausstattung der Zelle, metabolisiert werden [Heller et al. 1998; Holtzman 1991; Weller et al. 1983].

1.2.2 Eicosapentaensäure, Docosahexaensäure

Eicosapentaensäure (EPA; Abb. 5) und Docosahexaensäure (DHA) gehören zu den n-3-Fettsäuren, d.h. ihre letzte Doppelbindung liegt drei Kohlenstoffatome vom Methylende entfernt. EPA besitzt insgesamt 20 Kohlenstoffatome und fünf Doppelbindungen (C20:5:3).

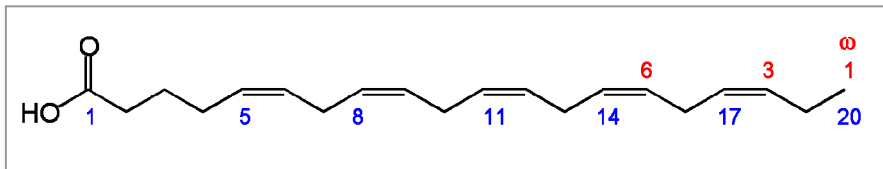


Abbildung 5: Eicosapentaensäure

Dagegen besteht DHA (Abb. 6) aus 22 Kohlenstoffatomen und sechs Doppelbindungen (C22:6:3).

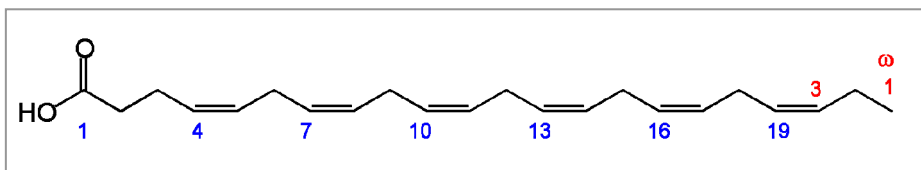


Abbildung 6: Docosahexaensäure

1.2.2.1 Metabolisierung von n-3-Fettsäuren

Wegen der strukturellen Ähnlichkeit der Eicosapentaensäure zur Arachidonsäure kann diese n-3-Fettsäure, im Gegensatz zu der Docosahexaensäure, auch von der Cyclooxygenase und der Lipxygenase als Substrat genutzt werden.

Die Cyclooxygenase metabolisiert die Eicosapentaensäure wie die Arachidonsäure mittels einer Bis-Dioxygenierung zu dem Zwischenprodukt Prostaglandin (PG) G₃ und dem Endoperoxid PGH₃. Aus diesem Endoperoxid werden alle Prostanoiden der 3er-

Serie abgeleitet. Dieser Index 3 (3er-Serie) gibt die Zahl der Doppelbindungen im Molekül an.

Der erste Schritt des Lipxygenase-Stoffwechselweges ist analog zur Oxidation der Arachidonsäure die Bildung eines instabilen Hydroperoxides (5-Hydroperoxyeicosa-pentaensäure, 5-HPEPE). Durch eine Hydroperoxidase kann das 5-HPEPE in die 5-Hydroxyeicosa-pentaensäure (5-HEPE) umgewandelt werden. Alternativ wird 5-HPEPE durch eine Dehydratase zu dem sehr instabilen Epoxid Leukotrien A₅ (LTA₅) metabolisiert. Das LTA₅ steht ähnlich wie LTA₄ an zentraler Stelle der Oxidation, da es zu unterschiedlichen Metaboliten umgewandelt werden kann. Die LTA-Hydrolase in Granulozyten oder Makrophagen katalysiert die enzymatische Umwandlung zu Leukotrien B₅ (LTB₅) [Grimminger et al. 1992]. Aus der Zusammenarbeit von Granulozyten und Endothelzellen entsteht aus LTA₅ das LTC₅, der erste Vertreter der 5er-Serie der Cysteinyl-Leukotriene.

1.2.3 Eicosanoide

Eicosanoide, oder auch Prostanoiden genannt, sind die Metaboliten, die im Cyclooxygenase-, Lipxygenase- und P 450 Cytochrom-Weg entstehen. Diese Leukotriene und Prostaglandine sind Abkömmlinge der Fettsäuren. Sie wirken sowohl als parakrine Mediatoren in einer Entzündung als auch als intrazelluläre Botenstoffe [Pacheco et al. 2002].

LTB₄ aktiviert Integrine, die zur endothelialen Adhäsion von Leukozyten führen. Außerdem ist LTB₄ ein Agonist der PAF-Synthese [Tessner et al. 1989], deren Folge die IL1-Synthese ist. Gleichzeitig fördert es die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten, die Superoxid-Synthese und die Freisetzung von Elastase in Granulozyten. LTB₅ hingegen besitzt im Vergleich zu LTB₄ eine signifikant verminderte Potenz bezüglich der Bildung pro-inflammatorischer Mediatoren.

Prostaglandine entstehen nach Metabolisierung durch das Enzym Cyclooxygenase. Auch hier kommt es zu unterschiedlichen Metaboliten bei den verschiedenen Fettsäuren. Aus der AA entstehen Prostaglandine (PG) und Thromboxan (Tx) der 2er-Serie. EPA ist das Substrat für die PG und Tx der 3er-Serie.

PGE₂ nimmt eine zentrale Stellung unter den PGs ein und ist für viele pro-inflammatorische Effekte verantwortlich. Es wirkt stark pro-inflammatorisch, führt zur Schmerzsensibilisierung und Temperaturerhöhung, es schützt jedoch auch die Magenschleimhaut durch Schleimproduktion. PGE₂ wirkt in vielen Gefäßgebieten vasodilatierend. Indessen verursacht PGD₂ eine Vaso- und Bronchokonstriktion. PGI₂ (Prostazyklin) inhibiert noch zusätzlich die Thrombozytenaggregation und verfügt über ausgeprägte vasodilatative Fähigkeiten [Seeger et al. 1984]. Thromboxan A₂ erhöht die vaskuläre Permeabilität, wirkt vasokonstriktiv und aktiviert Leukozyten [Holtzman 1991; Seeger and Lasch 1987; Seeger and Suttorp 1987].

Thromboxan A₃ und das Prostaglandin I₃ können die gleichen Rezeptoren zu TxA₂ und PGI₂ besetzen; weisen jedoch z.T. deutliche Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit auf. Zwar zeigt PGI₃ ähnlich starke Effekte wie PGI₂ hinsichtlich der vasodilatierenden Wirkung und des verminderten aggregatorischen Verhaltens, die biologischen Reaktionen auf TxA₃ sind jedoch im Gegensatz zu denen von TxA₂ zumindest in der Lunge deutlich vermindert [Grimminger et al. 1993b; Grimminger et al. 1995].

Versuche haben gezeigt, dass es in Thrombozyten bei einer Zufuhr von EPA zu einer kompetitiven Konkurrenz um die Metabolisierung durch die Cyclooxygenase kommt, wobei EPA im Vergleich zu AA bevorzugt wird und vermehrt TxA₃ metabolisiert wird [Kramer et al. 1996].

Experimente an neutrophilen Granulozyten zeigten, dass bei gleichem Angebot EPA im Vergleich zu AA besser zu dem Eicosanoid LTB₅ metabolisiert wurde [Grimminger et al. 1992].

Abgesehen davon, dass die Fettsäuren die Vorläufer für unterschiedliche Metaboliten sind, wird der Einbau von n-3- anstelle von n-6-Fettsäuren in den Membranphospholipid-Pools der Zellmembran als relevant für die lipid-abhängigen intrazellulären Signalereignisse („*Lipid signaling*“) betrachtet [Denys et al. 2005; Fowler et al. 1993].

1.2.4 Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)

1.2.4.1 Plättchen-aktivierender Faktor

Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) ist einer der stärksten pro-inflammatorisch wirkenden Mediatoren.

Anfang der 70-er Jahre wurde ein von Thrombozyten freigesetzter löslicher Faktor entdeckt, welcher vasoaktive Eigenschaften zeigte [Henson 1970]. Zwei Jahre darauf, 1972, wurde eine Substanz beschrieben, die eine Plättchenaggregation auslöst. Sie wurde „*platelet-activating factor*“, oder kurz PAF, genannt [Benveniste et al. 1972]. 1977 gelang es, diese Struktur des PAF als 1-O-Alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholin zu entschlüsseln [Benveniste et al. 1977].

1.2.4.1.1 Struktur des PAF

Der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF), ein Phospholipid, ist einer der potentesten und vielseitigsten Mediatoren, der in Säugetieren gefunden wird. Er gehört zu der übergeordneten Gruppe der biologisch aktiven, strukturähnlichen Alkyl-Phosphoglyceride. PAF vermittelt die Zell-zu-Zell Kommunikation, wobei er sowohl als interzellulärer als auch intrazellulärer Botenstoff wirkt. Zudem dient er als Botenstoff für verschiedene wichtige physiologische und pathologische Vorgänge im Körper.

Chemisch ist PAF der Lipidklasse 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-Phosphocholin zuzuordnen (siehe Abb. 7). Das Molekül unterscheidet sich von den häufigeren Glycerophospholipiden dadurch, dass die sn1-Position des Glycerophosphates über eine Etherbrücke mit dem Alkylrest verbunden ist und nicht, wie sonst bei den Phospholipiden üblich, über eine leicht hydrolisierbare Esterbindung einen Acylrest trägt. Die Natur des Alkylrestes besteht häufig aus einer gesättigten Kohlenstoffkette von 18 oder 16 C-Atomen. Ein weiteres Charakteristikum des PAF ist eine Acetylgruppe an der sn2-Position, wobei die Kürze der Kette die Potenz ausmacht. Auch die polare Gruppe an der sn3-Position ist wichtig für die Wirkstärke des PAF [Prescott et al. 1990].

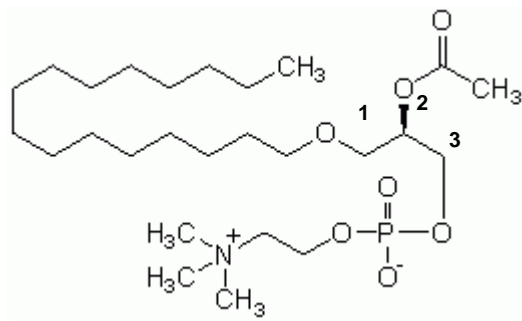


Abbildung 7: chemische Struktur des PAF

An die sn1-Position des Glycerins ist über eine Etherbindung eine C-16 oder C-18 Kohlenstoffkette gebunden. An der sn2-Position befindet sich eine Acetylgruppe, die die Wirkstärke des Moleküls ausmacht, und an der sn3-Position befindet sich eine polare Phosphatverbindung.

1.2.4.1.2 Synthese und Abbau von PAF

PAF wird nicht gespeichert, sondern erst dann produziert, wenn die Zelle stimuliert wird. Viele unterschiedliche Zellen können PAF synthetisieren und sezernieren. Hierzu zählen die Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten, Thrombozyten und Mastzellen. In Endothelzellen synthetisiertes PAF wird membranständig exprimiert und nicht sezerniert [Maclouf et al. 1989]. Sezerniertes PAF bindet rasch an Albumin, welches als Trägermolekül wirkt, und wird so zu Zielrezeptoren im Körper transportiert [Prescott et al. 2000].

Zur Synthese von PAF gibt es zwei verschiedenen Wege.

Der eine Weg ist der „*remodeling pathway*“ (Abb. 8). Dieser wird bei Entzündungen, Verletzungen und Stimulation von Entzündungszellen aktiviert. Initial wird die Phospholipase A₂ (PLA₂) durch einen Anstieg des zytoplasmatischen Calciums aktiviert. Diese katalysiert die Hydrolyse des Acyl-Restes an der sn2-Position des Membran-Phospholipids und setzt dabei eine Fettsäure frei. Die PLA₂ bevorzugt ein Phospholipid, an dessen sn2-Position sich Arachidonsäure befindet. Dadurch läuft dieser Prozess schneller ab und es entsteht mehr PAF pro Zeiteinheit, wenn AA in der

sn2-Position ist. Aus dieser Hydrolyse-Reaktion entsteht das Lyso-PAF (1-O-alkyl-sn-glycero-3-Phosphocholin), der biologisch inaktive Vorläufer des PAF. In einem zweiten Schritt wird mit Hilfe einer Acetyltransferase ein Acetylrest an die freie sn2-Position gehängt. Die Acetyltransferase unterscheidet dabei nicht zwischen dem inaktiven Lyso-PAF (1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholin) und dem Lysophosphocholin (Lyso-PC), das in der Zellmembran vorkommt. Beide werden von dem oben genannten Enzym in die hochaktive Form des PAF umgewandelt [Prescott et al. 2000]. Somit wird im Fall einer Entzündung von den Zellen nicht nur PAF, sondern zugleich auch Arachidonsäure produziert. Dadurch entstehen zwei biologisch aktive Lipide.

Der zweite Weg der PAF-Synthese ist der „*de novo pathway*“ (Abb. 8). Dieser Weg findet hauptsächlich in den Nieren und im Zentralen Nervensystem (ZNS) statt. Er ist unabhängig von Entzündungsreaktionen. Hierbei wird ein Ether-gebundenes Membranphospholipid mit Hilfe einer speziellen Acetyltransferase acetyliert. In weiteren Schritten wird der Phosphatrest von der sn3-Position entfernt und ein Phosphocholin hinzugefügt. Die Seitenketten 1 und 2 werden in diesem Syntheseweg nicht beeinflusst.

Die so produzierte Menge an PAF in der Niere übt eine steigernde Wirkung auf den Blutdruck aus und besitzt wahrscheinlich noch weitere physiologische Wirkungen.

Zu dem Abbau von PAF im Rahmen des „*remodeling pathway*“ wird das Enzym PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH) benötigt. Dieses Enzym wird einerseits in aktivierten Makrophagen synthetisiert und von diesen in das Blutgefäßsystem sezerniert. Es eliminiert das im Plasma vorkommende PAF. Andererseits spaltet die intrazelluläre PAF-Acetylhydrolase das intrazellulär vorkommende PAF [Zimmerman et al. 1996]. Diese PAF-Acetylhydrolase formt PAF zu Lyso-PAF um, indem es die kurze Akylkette an der sn2-Position abspaltet. So entsteht Lyso-PAF und ein Acetat [Prescott et al. 2000]. Lyso-PAF liegt nun wieder als inaktive Form vor und wird von dem Enzym Lyso-PC-Acyltransferase zu einem Membran-Phospholipid umgewandelt. Auf diese Weise trägt die von inflammatorisch aktivierten Makrophagen sezernierte PAF-Acetylhydrolase zur Entzündungsreduktion bei [Prescott et al. 1990].

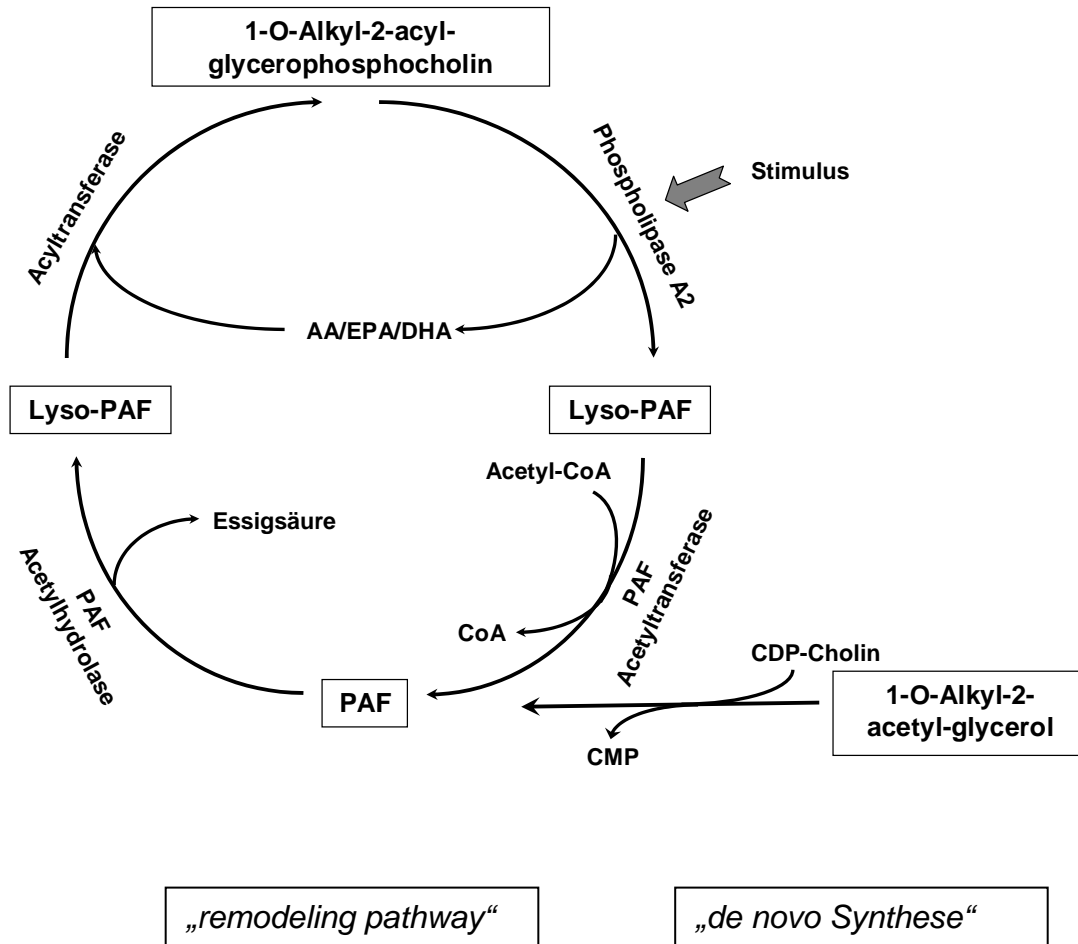


Abbildung 8: Synthese und Abbau des PAF

1.2.4.1.3 Wirkung des PAF

Die Wirkungen des PAF sind vielfältig. Seine primäre Aufgabe ist die Vermittlung von interzellulären Interaktionen. Er bindet nach seiner Synthese an Plasmamembranrezeptoren anderer Zellen. So werden diese aktiviert. Zusätzlich zu dem interzellulären Signalweg besitzt PAF auch autokrine und intrakrine Effekte [Zimmerman et al. 2002], wobei der intrakrine Weg über ein oder mehrere intrazelluläre Rezeptoren ablaufen kann [Prescott et al. 2000].

Zu den physiologisch wichtigen Aufgaben von PAF gehört insbesondere die Thrombozytenaggregation, welcher eine wichtige Funktion bei Gefäßverletzungen zukommt [Zimmerman et al. 2002]. Weitere Aktionen, bei denen PAF unterstützend

eingreift, sind die Phagozytose von Fremdkörpern und körpereigenen Abbauprodukten [Soares et al. 2002] und die Exozytose. Weiterhin bewirkt PAF Chemotaxis, Proliferation, Adhäsion und Degranulation von Leukozyten, sowie die Superoxidproduktion. Diese Superoxidproduktion führt zu dem „*respiratorischen burst*“ in Leukozyten. Weitere physiologische Vorgänge, die von PAF beeinflusst werden, sind die Calcium-Mobilisation und morphologische Veränderungen von Zellen.

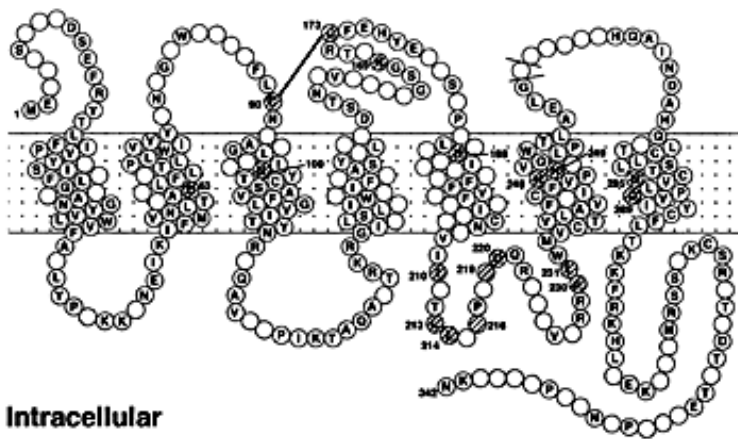
PAF spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei pathologischen Prozessen im Körper. So kann es die vaskuläre Permeabilität erhöhen. Dies führt einerseits zu Hypotension, andererseits kommt es durch diesen Flüssigkeitsverlust aus dem Gefäßbett zu einer Ödembildung im Gewebe. Diese gesteigerte vaskuläre Permeabilität bewirkt auch eine Beeinträchtigung der Herz- und Nierenfunktion. Die durch das Lipid ausgelöste Chemotaxis und Thrombozytenaggregation führt zu einer Neutropenie und Thrombozytopenie im Blut. Zusätzlich kann PAF auch die Translation und somit die vermehrte Synthese des Zytokins Pro-IL-1 β über NF- κ B induzieren [Zimmerman et al. 2002]. PAF ist ein potenter Bronchokonstriktor und spielt aus diesem Grund eine entscheidende Rolle beim Asthma bronchiale. Im schlimmsten Fall kann es durch eine starke Sekretion von PAF und die dadurch weiter ausgelösten Reaktionskaskaden sowohl zu einem anaphylaktischen Schock, als auch zu einer Sepsis und damit verbunden im weiteren Verlauf zu einem septischen Schock kommen [Casals-Stenzel 1987; Ishii et al. 1998; Nagaoka et al. 1991; Oettgen et al. 1994; Terashita et al. 1992; Zimmerman et al. 2002].

Eine Inflammation kann dadurch verstärkt werden, dass der PAF-Signalweg aufgrund des Entzündungsverlaufes dysreguliert ist [Prescott et al. 2000] und infolgedessen PAF vermehrt synthetisiert wird. Andererseits kommt es zu einer gesteigerten Entzündung, da in einer Sepsis der PAF-AH Spiegel, der zur Regulierung der Entzündungsvorgänge gebraucht wird, verringert ist. Ursächlich dafür sind Inaktivierung durch oxidative Angriffe und Verhinderung der Transkription und Expression durch Bakterientoxine [Zimmerman et al. 2002].

1.2.4.2 Plättchen-aktivierender Faktor - Rezeptor

Der Rezeptor des Plättchen-aktivierenden Faktors ist ein Plasmamembranrezeptor, der spezifisch PAF, aber auch PAF-verwandte Lipide erkennt (Abb. 9). Er wirkt als zentrale Komponente im PAF-Signalweg. Der Plasmamembranrezeptor für PAF gehört zu der Superfamilie der Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen („*seven transmembrane domains receptors*“), die an ein G-Protein gekoppelt sind [Zimmerman et al. 2002].

Extracellular



Intracellular

Abbildung 9: Struktur des PAF-Rezeptors

(Darstellung in Progress of Lipid Research, 2000; erstellt von Prof. Ishii, Tokio, Japan)

In dem humanen System ist der Rezeptor durch 342 Aminosäuren codiert, mit der entsprechenden Sequenz auf dem Gen 1p35-p34.4 [Chase et al. 1996]. In den Zellen, die normalerweise den Rezeptor exprimieren, scheint dieses Gen konstitutiv aktiv zu sein. Es kann zusätzlich von Entzündungsmediatoren sowie von PAF selbst reguliert werden [Thivierge et al. 1996].

Der PAF-Rezeptor ist über ein G-Protein an intrazelluläre Signaleenzyme und Signalkaskaden gekoppelt (Abb. 10). Die Arbeitsgruppen *Ali et al.*, und *Ishii et al* zeigten, dass der PAF-Rezeptor zwei verschiedene G-Proteine, Gi und Gq, mit jeweils daran gekoppelten Signalwegen aktiviert. Ausgelöst durch dieses Signal wird

einerseits das intrazelluläre Calcium erhöht, andererseits Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP₂) mit Hilfe der PI-Kinase zu PI-Triphosphat (PIP₃) phosphoryliert (*turn over*). Dadurch werden wiederum verschiedenen Kinasen, die unterhalb („*downstream*“) des Rezeptors liegen, aktiviert. So werden z.B. die Phosphatidylinositol-3-Kinase oder die Protein Kinase C (PKC) aktiviert [Ishii et al. 1998]. Neben der PI-Kinase wandelt auch die Phospholipase C (PLC) PIP₂ um. Die PLC wird nach Aktivierung des Rezeptors über die G-Proteine aktiviert und hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu den intrazellulären Botenstoffen Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃), Diacylglycerol (DAG) und freien Calciumionen. IP₃ führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration, wodurch wiederum die Phospholipase A₂ aktiviert werden kann. Diese katalysiert die Spaltung von Phospholipiden in der Zellmembran und z.B. AA wird freigesetzt. Im Anschluss daran aktivieren DAG und Ca²⁺ die Proteinkinase C (PKC). Dies führt zu einer Superoxid-Produktion und besitzt somit pro-inflammatorische Auswirkungen. Des Weiteren reguliert der PAF-Rezeptor auch die cyclischen AMP-Konzentrationen und beeinflusst den Phosphorylierungsstatus verschiedener Kinasen und Enzymsysteme [Ishii and Shimizu 2000].

Die Diversität der Signalkaskaden, die durch die Aktivierung des PAF-Rezeptors ausgelöst wird, erklärt die unterschiedlichen Auswirkungen und funktionellen Änderungen, die bei der Aktivierung dieses Rezeptors hervorgerufen werden.

Die Bindung von PAF an seinen Rezeptor kann dazu führen, dass eine Transkriptionsinduktion verschiedener Gene über den Nukleären Faktor-κB und weitere Transkriptionsfaktoren eingeleitet wird [Bazan et al. 1991; Weyrich et al. 1995].

An PAF-Rezeptor-Knock Out-Mäusen (Deletion des PAF-Rezeptors durch homologe Rekombination) konnten wichtige biologische und pathophysiologische Funktionen, insbesondere PAF-spezifische Signalkaskaden identifiziert werden [Ishii et al. 1997]. Prescott et al. konnten zeigen, dass der PAF-Rezeptor durch Phosphorylierung des Carboxylendes im Anschluss an die durch die Aktivierung ausgelöste Signaltransduktionen desensibilisiert wird [Prescott et al. 2000]. Die Desensibilisierung durch Phosphorylierung ist eine für G-Protein gekoppelte Rezeptoren typische Inaktivierung.

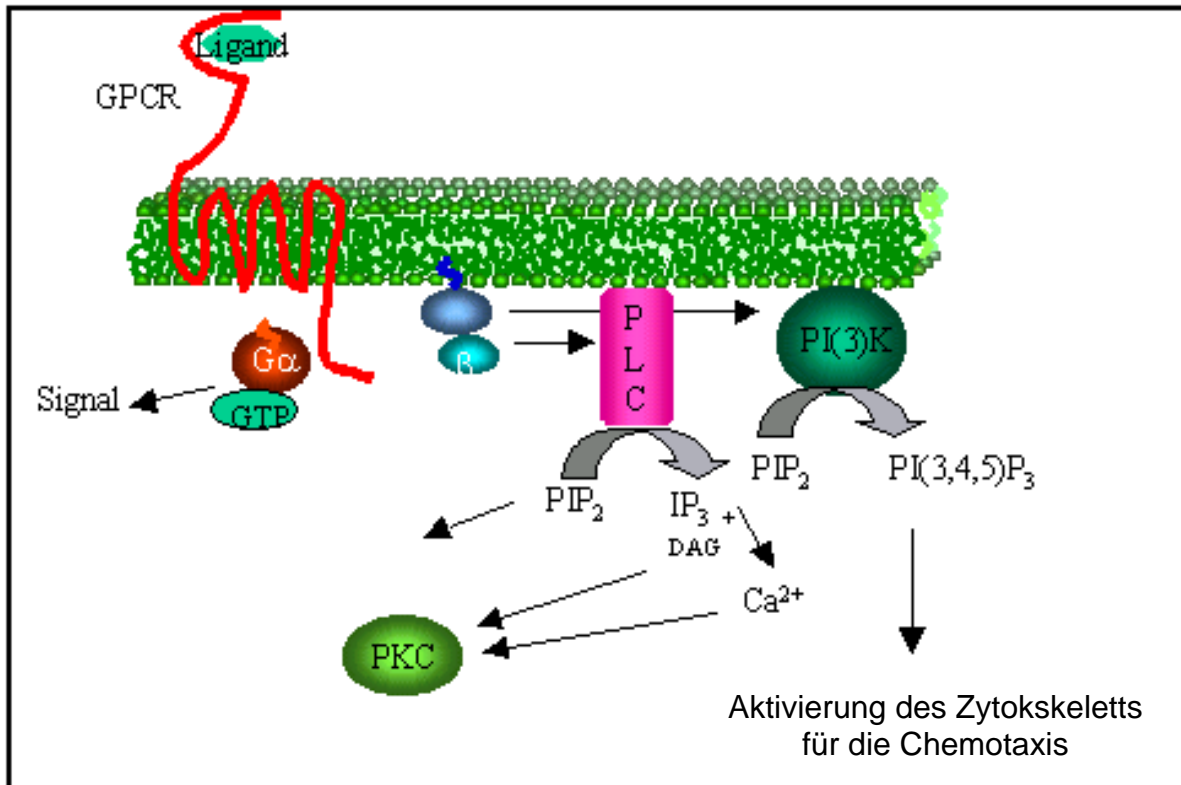


Abbildung 10: Signaltransduktionsweg des PAF-Rezeptors

Der Ligand bindet extrazellulär an den Rezeptor. Daraufhin kommt es zur Abspaltung zweier unterschiedlicher kleiner G-Proteine. Diese lösen jeweils verschiedene Signaltransduktionswege aus.

PIP₂ wird mit Hilfe der PLC zu IP₃, DAG und Ca⁺⁺ Ionen umgewandelt. DAG und Calciumionen aktivieren die PKC; es kommt zu einer Superoxidproduktion.

Der andere Signaltransduktionsweg führt auch über PIP₂, wobei es hier von der PI₃K zu PI-3,4,5-P₃ umgewandelt wird. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung des Zytoskeletts, um die Chemotaxis zu begünstigen (Graphik von University of Edinburgh erstellt).

1.2.4.3 PAF-Rezeptor-Antagonist

Es gibt verschiedene PAF-Rezeptor-Antagonisten, die in drei unterschiedlichen Strukturklassen eingeteilt werden können: die natürlichen Produkte, synthetische Strukturanaloga von PAF und als letzte Gruppe andere synthetische Verbindungen.

In die Gruppe der natürlichen Produkte gehören die Ginkgolide (A, B und C).

Zu den synthetischen PAF-Rezeptor-Antagonisten mit PAF-Strukturanalogen zählen CV-3988, CV-6209, TCV-309, E5880 und SRI 63-441. CV-3988 war der erste synthetische PAF-R-Antagonist.

In die Gruppe der synthetischen Verbindungen, die nicht analog zur Struktur des PAFs sind, gehören WEB 2086, Y-24180, BN 50727, BN 50730 (WEB-verwandt), L659,989 (mit einem Tetrahydrofuranrest), SM-12502, SR 27417, YM264 (Thiazolidin- und Pyridinreste), UK-74,505 und BB-882 (Methylimidazopyridinrest), welches auch *Lexipafant* genannt wird [Ishii and Shimizu 2000]. WEB 2086 wird auch *Apafand* genannt. Der Stoff entstand aus dem anxiolytischen Triazolobenzodiazepin und seine chemische Struktur ist nicht analog zu der Struktur von PAF oder anderer Lipide. Trotzdem ist die Spezifität und Potenz dieses PAF-Rezeptor-Antagonisten sehr hoch [Desouza et al. 2002; Peng et al. 2006].

Der in dieser Arbeit verwendete PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021 ist ein Ginkgolid B und gehört somit zur Familie der Ginkgolide (Abb. 11). Er gilt als das potenteste Mitglied dieser Familie.

BN 52021 ist ein spezifischer und effektiver PAF-Rezeptor-Antagonist, bei dem bereits nachgewiesen werden konnte, dass er PAF-ausgelöste Effekte abwendet. So wird z.B. bei Tieren einem durch Endotoxin ausgelösten Schock vorgebeugt. BN 52021 verhindert, dass PAF an den membranständigen Rezeptor bindet [Braquet et al. 1987].

Dieser Stoff wird aus den getrockneten Blättern des Ginkgo-Bilboa-Baumes gewonnen [Albrecht et al. 2004].

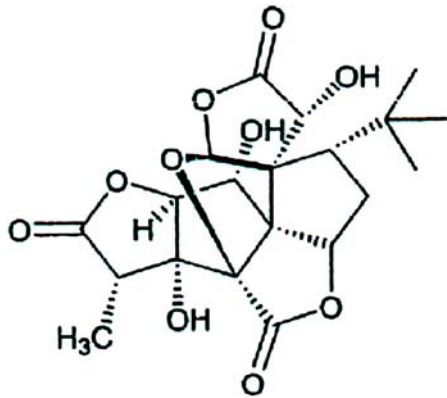


Abbildung 11: Chemische Strukturformel des Ginkgolid B

1.3 Rolle von Lipidemulsionen in der parenteralen Ernährung

Fettsäuren werden in verschiedene Klassen unterteilt. So werden essentielle von den nicht-essentiellen Fettsäuren und gesättigte von den ungesättigten Fettsäuren unterschieden.

Essentielle Fettsäuren können vom Menschen/Säugetier nicht selbst synthetisiert werden, d.h. sie müssen in bestimmter Menge über die Nahrung zugeführt werden. Zu dieser Gruppe gehören z.B. die Linol- und die Linolensäure. Aus diesen essentiellen Fettsäuren werden Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und auch Docosahexaensäure metabolisiert. Die Vorstufe für die Arachidonsäure ist die Linolsäure und für die Eicosapentaen- und Docosahexaensäure die Linolensäure.

Der Unterschied zwischen den gesättigten und den ungesättigten Fettsäuren liegt darin, dass die ungesättigten Fettsäuren in ihrer chemischen Struktur eine bis mehrere Doppelbindungen besitzen. Durch die Doppelbindungen sind die Fettsäuren in der Lage, durch Radikale oxidiert zu werden. Diese werden unter Aufspaltung der Doppelbindung in eine Einfachbindung an die Fettsäure gebunden.

Die Fette, die täglich mit der Nahrung oral aufgenommen werden, werden normalerweise zu 95 % im Dünndarm resorbiert. Die Triglyzeride der Nahrung werden im Magen-Darm-Trakt zu freien Fettsäuren und 2-Monoglyzeriden, Glycerinmoleküle mit einer gebundenen Fettsäure, gespalten. Dies geschieht durch Lipasen, die in den Zungendrüsen oder im Pankreassaft gebildet werden. Die enzymatische Aufschließung der Nahrungsfette ist eine Voraussetzung für eine normale Absorption. Unter Mitwirkung von Gallensalzen bilden sich aus den Monoglyzeriden und den Fettsäuren spontan Micellen, die so durch die Zellmembran in die Enterozyten diffundieren können. Die kurzkettigen Fettsäuren sind relativ gut wasserlöslich und können deshalb direkt über das Kapillarsystem in den Pfortaderkreislauf gelangen. Dort werden sie an Albumin gebunden und zu den Körperzellen transportiert. Die langkettigen Fettsäuren hingegen können die Zellwände nicht passieren. Die Spaltprodukte dieser Fettsäuren diffundieren in die Enterozyten und werden im endoplasmatischen Retikulum durch Veresterung wieder in Triglyzeride umgewandelt. Anschließend werden sie von einem Eiweißmantel umhüllt. Fettsäuren und Eiweißmantel bilden zusammen die so genannten Chylomikronen, die nun an die Lymphstrombahn abgegeben werden und von dort

schließlich in die Blutstrombahn gelangen und dem Körper zur Verfügung stehen [Despopoulos 2007].

Freie Fettsäuren besitzen eine Detergenz-ähnliche Wirkung auf Membranen und führen dadurch zu einer größeren Permeabilität und verbesserte Inkorporation in die Zellmembran. Die Fettsäuren können sich ohne Beteiligung eines Proteins von ihren Bindungsstellen am Albumin lösen und sich an die äußere Plasmamembran anlagern [Hamilton 1998]. Auf diese Weise können sie mit den Fettsäuren der Zellmembran fusionieren. Sie werden fast ausschließlich an das 2. Kohlenstoffatom des Glycerol in den Phospholipiden gebunden [Sardesai 1992].

Fett wird von allen Zellen des Körpers u.a. zum Aufbau der Zellmembranen benötigt. Hierbei bewirken ungesättigte Fettsäuren eine hohe Fluidität der Zellmembran, wohingegen ein hohes Maß an gesättigten Fettsäuren einen Verlust an Elastizität und Fluidität bedingt, die Zellmembran wird rigider. Zudem dienen Fettsäuren dem Körper aufgrund ihrer Energiedichte als Hauptenergielieferant.

Bei der Fettaufnahme über die Darmmukosa ist erst nach Wochen bzw. Monaten kontinuierlicher oraler Aufnahme ein erkennbar veränderter Fettsäurespiegel im Plasma erreicht [Mayer et al. 2002a].

Lipidemulsionen sind Mischungen aus Triglyzeriden und einem Emulgator, der dazu dient, diese Emulsion aus Wasser und Triglyzeriden in einem feindispersen Gleichgewicht zu halten. Ein Gewinn der Infusion von Lipidemulsionen liegt darin, dass die Fettsäuren den Gastro-Intestinaltrakt umgehen und direkt in das Blutssystem gelangen. Ein weiterer Effekt dieser Applikationstechnik ist, dass die Fetttröpfchen durch Bindung und Mitnahme bei Weiterrollen zu einer Translokation des membran-gebundenen Enzyms in das Plasma führen und somit die endotheliale Lipoprotein-Lipase aktivieren. Die aktivierte Lipoprotein-Lipase spaltet dann die infundierten Triglyzeride in freie Fettsäuren und infolgedessen auch zu einer direkten, starken Erhöhung des Plasmaspiegels an freien Fettsäuren [Grimminger et al. 1993a; Peterson et al. 1990]. Diese wiederum können nun von den Zellen aufgenommen und in die Zellmembran eingebaut werden [Grimminger et al. 1993a; Mayer et al. 2003a; Mayer et al. 2003b].

Intensivpflichtige Patienten mit akutem Lungenversagen werden regelmäßig mit konventionellen Lipidemulsionen ernährt. Dabei kommt es zu einer Freisetzung von

Arachidonsäure oder ihrer Vorstufen aus den infundierten Fetten, die den Enzymen zur Verfügung stehen [Mayer et al. 2003a]. Aus der Arachidonsäure gebildete Lipidmediatoren lenken die inflammatorischen Prozesse in der Lunge. Sie umfassen von der Cyclooxygenase (COX) abgeleitete Prostaglandine und Thromboxan und die Metaboliten der Lipoxygenase (LOX) wie Leukotriene. Auf diese Weise kann die Ernährung mit Lipidemulsionen u.a zu einer Steigerung der Prostanoidsynthese führen (Abb. 12). Durch die Wahl der Emulsion und ihrer Zusammensetzung kann auch die Zusammensetzung der freien Fettsäuren im Plasma moduliert werden [Mayer et al. 2003c].

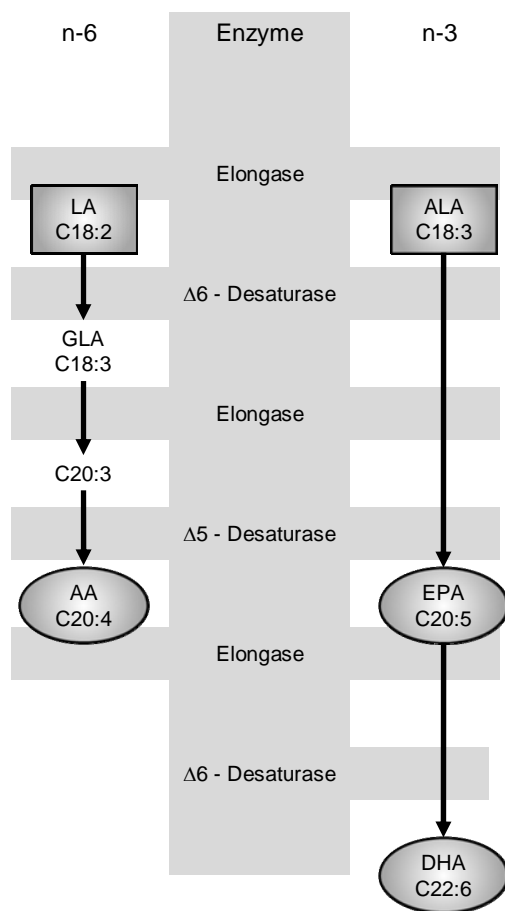


Abbildung 12: Fettsäure-Umbau und -Synthese

Der Umbau und die Synthese der Fettsäuren erfolgt über verschiedene Enzyme. Dabei wird eine Kombination aus Desaturasen und Elongasen genutzt.

N-6-Fettsäuren werden aus der Vorstufe Linolsäure (LA) über die γ -Linolensäure (GLA), eine n-6-Eicosatriensäure (C20:3:6) bis hin zur Arachidonsäure (AA) synthetisiert.

Die Synthese der n-3-Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) erfolgt aus der α -Linolensäure (ALA) durch Kettenverlängerung und Desaturierung.

Bei diesen Experimenten wurden zwei unterschiedliche Lipidemulsionen verwendet. Die eine Fettsäureemulsion enthält 10% Lipide, die aus Sojabohnenöl gewonnen wurden. Sie enthalten einen großen Anteil an Linolsäure, die im Körper zu Arachidonsäure verstoffwechselt wird.

Diese Lipidemulsion wird im nachfolgenden Text auch mit „SO“ abgekürzt.

Die andere Lipidemulsion besteht zu 10% aus Lipiden, die aus Kaltwasserfischen gewonnen wurden. Sie enthalten hohe Mengen an n-3-Fetten (EPA und DHA). Gewonnen wurden diese aus Fischfettölsäuren. Es sind hauptsächlich EPA und DHA.

Diese Lipidemulsion wird im nachfolgenden Text auch mit „FO“ abgekürzt.

Auflistung der prozentuellen Zusammensetzung der beiden Infusionslösungen – aufgeteilt nach Fettsäure-Muster:

Fettsäure (g/l)	n-6 Lipidemulsion	n-3 Lipidemulsion ¹
	SO	FO
C14:0	-	4.9
C16:0	12.4	10.7
C16:1 n-7	-	8.2
C18:0	5.0	2.4
C18:1 n-9	24.1	12.3
C18:2 n-6	52.2	3.7
C18:3 n-3	8.2	1.3
C20:4 n-6	-	2.6
C20:5 n-3	-	18.8
C22:5 n-3	-	2.8
C22:6 n-3	-	16.5
andere	-	16.1

¹ Die n-6 (Lipovenös®) und die n-3 Lipidemulsion (Omegaven®) wurden unter gleichen Bedingungen unter Zuführung identischer Zusatzmittel hergestellt. Wiederholte Gaschromatische Überprüfung beider Lipidemulsionen zeigten weniger als 0,3 % freier EPA oder AA in Bezug auf die esterifizierte Menge dieser Fettsäuren

Abbildung 13: Inhaltszusammensetzung der verwendeten Lipidemulsionen

1.4 Fragestellung

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Zusammenhänge beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit den Auswirkungen verschiedener Lipidemulsionen auf ein akutes Lungenversagen im Mausmodell. Dieses Model wurde in Anlehnung an die parenterale Ernährung kritisch kranker Patienten mit Lipidemulsionen etabliert.

Folgende Fragestellungen sollten hierbei untersucht werden:

- 1) In wie weit beeinflusst eine als Standard in der parenteralen Ernährung angewandte n-6-basierte Lipidemulsion ein akutes Lungenversagen im Mausmodell. Welche Effekte hat eine alternativ angewandte n-3-basierte Lipidemulsion auf dieses Krankheitsbild?
- 2) Ist der PAF-Rezeptor an der Vermittlung der positiven/negativen Effekte der Lipidemulsionen beteiligt?
- 3) Gibt es einen Unterschied zwischen Effekten in PAF-Rezeptor-Knock Out-Mäusen und einer kurzfristigen pharmakologischen Inhibition durch PAF-R-Antagonisten in Wildtypmäusen im Hinblick auf die Effekte der Lipidemulsionen auf eine ausgelöste Lungenentzündung?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere standen verschiedene Mauslinien zur Verfügung. Zum einen wurden männliche Balb/C-Mäuse verwendet. Diese Tiere der Inzuchtlinie wurden bei Charles River, Sulzfeld, Deutschland, bestellt.

Eine weitere verwendete Linie ist eine von Prof. Satoshi Ishii, Tokio, Japan generierte Knock Out-Linie. Der genetische Hintergrund dieser Mäuse beruht auf Balb/C-Mäusen. Hier wurde der PAF-Rezeptor sowohl leukozytär als auch endothelial deletiert. Drei Zuchtpaare dieser Mäuse wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt und in den Räumen des Zentralen Tierlabors weitergezüchtet.

Die Aufzucht und Haltung der Tiere erfolgte entsprechend artgerechter Haltung in transparenten Polycarbonatkäfigen unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20 – 22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Futter (ssniff R/M-H) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Im Alter von vier Wochen wurden die Jungtiere abgesetzt, geschlechtlich getrennt in Gruppen zu max. 5 Mäusen und unter oben genannten Bedingungen aufgezogen.

Die Mäuse wurden mit einem Gewicht von 22-24g in die Experimente eingesetzt.

2.2 Geräte und Materialien

2.2.1 Materialien für die Tierhaltung

Mäuse

PAF-R-KO-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Satoshi Ishii, Tokio, Japan zur Verfügung gestellt

Balb/C-Mäuse von Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland

Käfige

Makrolon, Typ II L; Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland

Tiereinstreu

Altromin Tiereinstreu-Granulat; Altromin GmbH + Co. KG, Lage-Lippe, Deutschland

Tierfutter

Ssniff R/M-H, Alleinfuttermittel für Ratten- und Mäuse-Haltung;

ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland

Global Rodent Breed; Harlan Teklad, Bicester, UK

2.2.2 Geräte und Materialien für die *in-vivo*-Eingriffe

2.2.2.1 Geräte

Intravenöser Katheter

Katheter F. Certofix-Mono; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Tube silicone platinum, Fisher Bioblock Scientific, Schwerte, Deutschland

Mini-osmotische Pumpe

ALZET Osmotische Pumpe, Modell 2004 und 2001D; Durect Corporation, Cupertino, USA

Operationsbesteck

Verschiedene Scheren, Pinzetten, Klemmen, Nadelhalter;

Rebstock Instruments GmbH, Dürbheim, Deutschland

Operationsmikroskop

Stereolupe Leica MS 5; Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland

2.2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Narkosemittel

Ketavet 100 mg/ml; Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland

Rompun 2 %; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland

Desinfizierende Lösung

Braunoderm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Infusionslösungen

Isotonische Natriumchlorid-Lösung DeltaSelect; DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland

Glucose 10 Braun; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Lipidemulsionen

Die Zusammensetzung der bei dieser Arbeit verwendeten Lipidemulsionen sieht folgendermaßen aus:

Lipovenös 10 % PLR, Phospho Lipid Reduziert (LCT10); Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

In 1 l:

Sojabohnenöl 100g

Glycerol 25g

Phospholipide aus Ei 6g

Omegaven-Fresenius; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

von Hochseefischen 100g:

EPA 1,25 – 2,82g

DHA 1,44 - 3,09g

α -Tocopheral (Antioxidans) 0,015 - 0,0296g

Heparin

Heparin-Natrium 25000 IE/5 ml; ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

Heparin zur subcutan-Injektion: 10 IE/200 μ l

PAF-Rezeptor-Antagonist

BN 52021, ein Ginkgolid B; Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland

BD Mikro-Fine (Spritze), 30G x 8 mm; Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Inflammatorischer Stimulus

Lipopolysaccharid von E.coli (Serotyp O111:B4); Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

Venenverweilkatheter

Vasocan Braunüle 22G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Augensalbe

Bepanthen Augen- und Nasensalbe 5 g; Roche, Eppstein-Bremthal, Deutschland

Nahtmaterial

Ethicon Ethibond Excel 5-0, Polyester beschichtete Fäden ohne Nadel; Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien

Ethicon Prolene 6-0, monofil mit atraumatischer Nadel; Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien

Ethicon Mersilene 1, Polyester; Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien

2.2.3 Geräte, Materialien und Chemikalien für die *in-vitro*-Bestimmungen

2.2.3.1 Geräte

Zentrifugen

Hettich Rotanta/AP; Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Cytospin 3; Shandon, Frankfurt a.M., Deutschland

Leukozytenzählung

Sysmex KX-21; Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland

Neubauer Zählkammer; Labor Optik, Friedrichsdorf, Deutschland

Leukozytendifferenzierung

May-Grünwald Färbelösung; Merck, Darmstadt, Deutschland

Giensa Stammlösung; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

Mikroskop

Dialux Mikroskop; Olympus, Wiesbaden-Delkenheim, Deutschland

Wärmeschrank

Memmert; Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland

Homogenisator

Ultra-Turrax T8; Ika-Werke GmbH + Co. KG, Staufen, Deutschland

Dispergierwerkzeug klein, Durchmesser: 5 mm

ELISA-Reader

SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland

2.2.3.2 Verbrauchsmaterialien

Blutentnahmesystem

Beschichtet mit EDTA; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Kanülen

Verschieden-lumige Kanülen, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Vasocan Braunüle, 20G; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Objektträger mit Rand

R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland

96-well Mikrotiterplatte

Nunc, Roskilde, Dänemark

Röhrchen

13 ml Röhrchen, Polysterol; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.2.3.3 Chemikalien

BAL-Lösung

400 ml PBS (Pufferlösung aus: NaCl, KCl, Na₂HPO₄·xH₂O, KH₂PO₄, Aqua dest)
plus 100 ml EDTA 1 %; Biochrom AG, Berlin, Deutschland

ELISA

TNF- α Duo-Set; R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland

MIP-2 Duo-Set; R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland

Waschpuffer: 1000 ml Aqua dest,

2,4 g TRIS; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

0,5 ml Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaureate);

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

pH: 7,3

Blockpuffer: 100 ml PBS 1x

1 g Bovine Serum Albumin; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

5 g Saccharose; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

0,05 g NaN₃; Merck, Darmstadt, Deutschland

Diluent: 200 ml Aqua dest.

0,2 g BSA; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

0,1 ml Tween 20; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

0,48 g TRIS Base; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

1,75 g NaCl; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

pH: 7,3

Streptavidin Horseradish Peroxidase Conjugate (HRP); Zymed, San Francisco, USA

H₂SO₄ (1 M); Merck, Darmstadt, Deutschland

Proteinbestimmung

BioRad DC Protein Assay; BioRad, Bad Nauheim, Deutschland

1,42 mg/ml BSA

Lösung A: 1 ml Reagenz A + 20 µl Reagenz S

Myeloperoxidase Aktivitätsassay

MPO-Puffer: Lösung A: 6.8 g KH₂PO₄ in 1000 ml dH₂O

Lösung B: 8,7 g K₂HPO₄ in 1000 ml dH₂O

22ml Lösung B + 178 ml Lösung A

HTAB-Puffer: 5 g HTAB (Hexaheyltrimethylammonium Bromid) in 1000 ml MPO Puffer

o-Dianisidin Lösung: 0,0167 g o-Dianisidin HCl + 90 ml H₂O + 10 ml MPO Puffer
+ 50 µl 1 % H₂O₂

2.3 *In-vivo*-Eingriffe

2.3.1 Anästhesie

Für alle Eingriffe wurde eine intra-peritoneale Injektionsnarkose durchgeführt. Hierfür wurde eine Spritze mit zwei Anteilen 0,9 %ige NaCl-Lösung, einem Anteil Ketavet 10 % und einem Anteil Xylazin 2 % aufgezogen.

Die Maus wurde fixiert, ventral paramedian abdominal eingestochen und je nach Vorhaben ein Gesamtvolumen von 70-100 µl injiziert.

2.3.2 Katheterimplantation

Bevor mit der eigentlichen OP begonnen werden konnte, musste ein Katheter für die Infusion hergestellt werden (Abb. 14). Hierzu wurde ein 1,3 cm langes Stück incl. Spitze eines Katheters (Fa. B. Braun) abgeschnitten und in einen 5 cm langen Silikonschlauch (Tube silicone platinum) auf 0,5 cm Länge gesteckt.



Abbildung 14: Venen-Katheter für die OP

Die Pumpe, mit einer Pumpleistung von 28 Tagen wurde mindestens 24 Stunden vor der OP mit einer 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung präpariert, um anschließend für 24 Stunden im Wärmeschrank aktiviert werden zu können.

Zur operativen Katheterimplantation wurde die Maus mit der oben beschriebenen Anästhesie in Narkose gelegt. Dann wurden zuerst eine kleine Stelle zwischen den Ohren auf dem Rücken und die ventrale Halsseite rasiert. Zur Vorbeugung der Austrocknung der Augen während der OP wurde Bepanthensalbe auf die Augen aufgetragen. Nun wurde die Maus in Rückenlage auf den OP-Tisch unter eine Lupe gelegt und fixiert. Es folgte ein ca. 2 cm langer Schnitt auf der linken ventralen Halsseite paramedian (Abb. 15). Dann wurde die V. jugularis stumpf freipräpariert, indem das Unterhautfettgewebe entfernt wurde. Lag die V. jugularis sichtbar vor, wurde über den cranial sichtbaren Teil eine Schlinge gelegt und abgebunden. Um

den caudal sichtbaren Teil wurde ebenfalls eine Schlinge gelegt, die noch nicht gezogen wurde, da mit dieser später der Katheter eingebunden wurde.

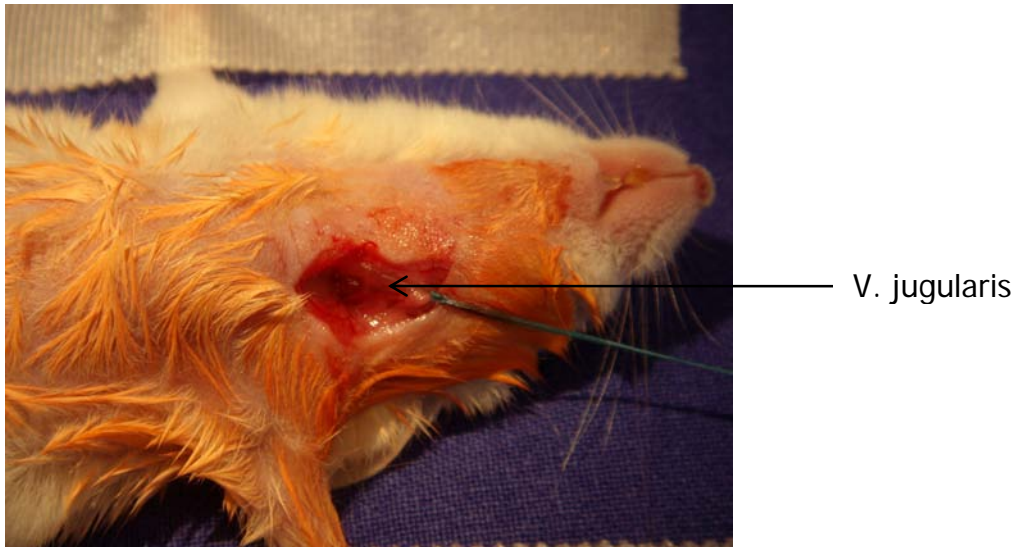


Abbildung 15: Präparation der V. jugularis und umschlingen mit Faden

Jetzt wurde die Maus auf den Bauch gedreht und ein kleiner Schnitt zwischen den Ohren vorgenommen. Hierdurch wurde unter der Haut bis zur Ventralseite der vorbereitete Katheter, der vorher in eine Schleife gelegt und gebunden wurde, durchgezogen. Eine mit 0,9 %ige NaCl-Lösung gefüllte Spritze wurde aufgesetzt und eventuelle Luftbläschen wurden ausgespült. Nun wurde die Maus wieder auf den Rücken gedreht, um an dem cranialen Faden die Vene straff zuziehen.

Mit einer Schere wurde in einem 30°-Winkel ein Schnitt bis auf 1/3 der Breite der Vene vorgenommen. Durch diese Öffnung wurde der Katheter auf eine Länge von ca. 4 mm in die Vene geschoben. Mit der caudalen Fadenschleife wurde der in der Vene liegende Katheter eingebunden.

Aus Sicherheitsgründen wurde eine zweite Ligatur gesetzt. Um die Lage des Katheters zu überprüfen, wurde die NaCl-Lösung in die Vene injiziert und danach mit der Spritze aspiriert (Abb. 16). Nun sollte sich Blut im Katheter befinden.



Abbildung 16: Überprüfung der Lage des Katheters

An Hand des aspirierten Blutes im Katheter kann man deutlich erkennen, dass er in der V. jugularis der Maus liegt.

War dies der Fall, konnte man die Fäden kurz oberhalb des Knotens abschneiden. Die Maus wurde jetzt sowohl ventral als auch dorsal mit Einzelheften zugenäht.

Das Ende des Silikonschlauches wurde auf den Flowmoderator einer 28 d-Pumpe gesteckt. Diese befand sich in einem mit Kochsalzlösung gefülltem 1,5 ml-Eppendorf Cup, um den herum Draht gewickelt war, sodass man diese Konstruktion auch auf dem Rücken der Maus mit Nahtmaterial befestigen konnte (Abb. 17).

Zur Erholung von der OP und um den Flüssigkeitsverlust auszugleichen, wurde der Maus 1 ml einer 5 % Glucose-Lösung subkutan injiziert. Danach kam sie zum Aufwachen in ihren Käfig.



Abbildung 17: eine operierte Maus mit auf dem Rücken befindlicher 28d-Pumpe

2.3.3 Wechsel der Infusionen

Bevor die Pumpe gewechselt werden konnte, musste eine neue befüllt werden. Hierfür gab man zu 1 ml Fettsäure-Lösung 4 µl Heparin 25000 I.E./5 ml. Dann zog man dieses Gemisch auf und befüllte mit der mitgelieferten Füllkanüle die Pumpe unter sterilen Bedingungen. Im Anschluss daran wurde der Flowmoderator wieder in die Pumpe (Abb. 18) gesteckt und diese kam in ein mit 2 ml Aqua gefülltes 15 ml Falcon-Röhrchen und dann für 3 Stunden in ein 37°C warmes Wasserbad, um entsprechend der Gebrauchsinformation aktiviert zu werden.

Nun konnte man die Pumpe auf dem Rücken der Maus auswechseln. Die alte Pumpe wurde aus dem Eppendorf-Cup genommen und die neue auf den Flowmoderator aufgesteckt. Das Wasser im Cup wurde aufgefüllt und wieder verschlossen.

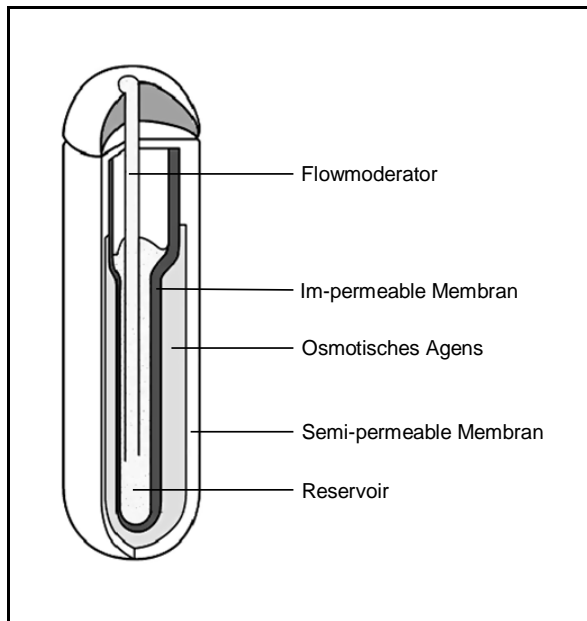


Abbildung 18: Aufbau einer ALZET osmotischen Pumpe

Umhüllt ist die Pumpe außen mit einer semi-permeablen Membran. Im Inneren befindet sich ein flüssigkeitsgefülltes Säckchen, dass durch die einströmende Flüssigkeit komprimiert wird. Dadurch wird die sich im Innern des Reservoir-Säckchen vorhandene Flüssigkeit durch den Flowmoderator in den Schlauch und so letztendlich in die Vene der Maus gepumpt (Abbildung von ALZET).

2.3.4 LPS-Instillation in die Trachea

Um eine Inflammation der Lunge hervorzurufen, wurde ein Endotoxin, hier LPS von E.coli, in die Lunge instilliert.

Hierfür wurde die Maus anästhesiert. Nach Erreichen der erwünschten Anästhesietiefe, wurde die Maus an den oberen Schneidezähnen auf ein Gestell gehängt, damit man unter Sichtkontrolle und mit Hilfe eines Mikroskops einen Katheter via Mundhöhle in die Trachea einführen konnte. Ein Katheter (Vasocan Braunüle, 22G) wurde an den Stimmbändern vorbei in die Trachea eingeführt. Nun wurde ein Gesamtvolumen von 50 µl (Gemisch aus 1 oder 10 µg LPS und 0,9 %iger NaCl) langsam in zwei bis drei Portionen in die Lunge eingegeben. Zwischendurch mussten Pausen eingelegt werden, damit die Maus die Menge an Flüssigkeit resorbieren konnte. Danach wurde der Katheter mit einer Menge von ca. 150 µl Luft durchgespült.

2.3.5 Applikation des PAF-Rezeptor-Antagonisten

Der PAF-Rezeptor-Antagonist wurde 30 min vor Gabe des LPS injiziert. Hierfür wurde ebenfalls eine Anästhesie an den Mäusen vorgenommen und der Rezeptor-Antagonist in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht in einem Flüssigkeitsvolumen von ca. 100 µl in die zuvor desinfizierte seitliche Schwanzvene injiziert. Dafür wurde mit einer 30G-Kanüle in die Vene gestochen und der zu applizierende PAF-Rezeptor-Antagonist langsam i.v. injiziert.

2.3.6 Blutentnahme

Zuerst wurde die Maus anästhesiert, danach wurde sie auf dem Rücken liegend fixiert und die Abdominalhöhle eröffnet. Nun wurde die V. cava caudalis freigelegt und aus dieser mit einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle (BD Microlance 3, 26G) bis zu 800 µl Blut entnommen. Die Abnahme dieser großen Menge Blut führte zum Tod des Tieres.

Das Blut wurde im Hinblick auf einer Leukozytenanalyse untersucht.

Zur Bestimmung der Leukozytenzahl wurde das Blut in ein Röhrchen, besprüht mit EDTA, umgefüllt.

Danach wurden die Blutröhrchen bei 1076 g 10 min lang zentrifugiert. Das Serum wurde für die weitere Verwendung abpipettiert und bei -20 ° C eingefroren.

2.3.7 Broncho-alveoläre Lavage (BAL)

Die euthanasierte Maus wurde auf dem Rücken liegend fixiert. Danach wurde ein ca. 2 cm langer Schnitt in der Medianen der ventralen Halsseite vorgenommen und die beiden subkutan liegenden Speicheldrüsen in der Mitte stumpf abpräpariert. Nun wurde noch der M. trachealis, der die Trachea bedeckt, durchtrennt. Die Trachea lag sichtbar vor. Nun wurde durch einen Schnitt zwischen zwei Knorpelspangen ein Katheter (Vasocan Braunüle, 20G) in die Trachea eingeführt und eingebunden.

Daraufhin wurde mit einem eiskalten Gemisch aus PBS und EDTA die Lunge gespült. Zuerst wurde ein Volumen von 200 µl eingebracht, um die Lunge vorzudehnen. Danach wurde mit ca. 350 µl gespült, bis ein 1,5 ml Eppendorf Cup gefüllt war. Danach wurde dieses bei 336 g 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren. Das Zellpellet wurde in 1 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

2.3.8 Organentnahme

Nach dem Tod des Tieres wurde die Lunge zur weiteren Analyse entnommen.

2.4 *In-vitro*-Bestimmungen

2.4.1 Leukozyten-Zahl in der broncho-alveolären Lavage

Nachdem die Lunge lavagiert, die Flüssigkeit zentrifugiert und der Überstand abpipettiert wurde, konnte das Zellpellet mit einer 0,9 % Natriumchlorid-Lösung resuspendiert werden. Eine Neubauerkammer wurde mit 10 µl dieser Lösung beschickt und die Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Für die Gesamtzahl wurden 16 Kleinquadrate ausgezählt. Zur Errechnung der Gesamtanzahl in der BAL-Flüssigkeit und somit auch in den Lungenalveolen wurde die gezählte Zahl mit 10000 multipliziert.

Zur Überprüfung konnte man das Cup anschließend nehmen und die Zellzahl mittels des Blutzellzählgerät Sysmex, KX-21 zählen lassen.

2.4.2 Differenzierung der Leukozyten in der BAL

Um einen prozentualen Überblick der verschiedenen Leukozyten-Populationen in der Lavage zu erhalten, wurden die Leukozyten mittels des Cytospin 3 (5 min, 5000 rpm) auf einen Objektträger aufgebracht. Danach wurden die Zellen mit einer Pappenheim-Färbung (May-Grünwald-Giemsa) angefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt.

2.4.3 Leukozyten-Zahl im peripheren Blut

Nachdem man der Maus Blut aus der Vena cava caudalis abgenommen hatte, füllte man das Blut aus der Spritze in ein mit EDTA beschichtetes Röhrchen um. Dieses wurde nun geschwenkt, um das Blut mit dem EDTA zu vermischen.

Die Zellzahl im peripheren Blut wurde mit Hilfe des Blutzellzählgeräts Sysmex, KX-21 bestimmt. Die Gesamt-Leukozytenzahl wird in 10^6 pro ml angegeben.

2.4.4 ELISA (TNF- α und MIP-2)

Zuerst wurden die ELISA-Platten mit dem *Capture-Antibody* (Erst-Antikörper), der mit 1x PBS verdünnt wurde, beschichtet und bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Je nach Test verwendete man entweder goat anti-mouse TNF- α oder rat anti-mouse Macrophage Inflammatory Protein - 2 (MIP-2).

Am nächsten Tag wusch man die vorbeschichteten Platten dreimal mit dem Waschpuffer und blockte die unspezifischen Bindungen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Blockpuffer. Als Nächstes wurde eine Standard-Verdünnungsreihe für den jeweiligen ELISA angesetzt. Hierfür wurde als Lösungsmittel Diluent genommen. Im Anschluss an die Inkubation mit dem Blockpuffer wurde dieser durch Waschen entfernt und die Standardreihe und die Proben (broncho-alveoläre Lavage) in die einzelnen wells pipettiert. Nun ließ man den ELISA für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren, damit sich das Antigen an die am Boden haftenden Antikörper binden konnte. Nach zwei Stunden wurde das

überschüssige Antigen im Überstand dreimal mit dem Waschpuffer ausgewaschen. Nun wurde der bereits verdünnte biotinmarkierte *Detection-Antibody* (Zweit-Antikörper) auf die Platte pipettiert. Hierfür wurde entweder biotinylated goat anti-mouse TNF- α oder biotinylated goat anti-mouse MIP-2 verwendet. Während der zwei Stunden, in denen die Platten bei Raumtemperatur standen, konnte sich der Zweitantikörper an das gebundene Antigen binden. Nach Ablauf der Wartezeit wurden die nicht gebundenen Antikörper abgewaschen. Der nächste Schritt war die Zugabe von Streptavidin, ein Protein mit hoher Affinität zu Biotin, in verdünnter Form in die Vertiefungen für 20 min. Streptavidin besteht aus vier Untereinheiten, die jeweils mit einem Biotinmolekül binden können. Eine Untereinheit bindet an den biotinmarkierten Zielantikörper. Die restlichen Untereinheiten binden an ein enzymkonjugiertes Biotin. Da das Enzym bei dem Substrat einen Farbumschlag bewirkt, kommt es so zu einer Verstärkung der späteren Farbreaktion. Auch hier wurden wieder die überzähligen Moleküle ausgewaschen. Letztendlich wurde das Substrat hinzugegeben und 20 min wirken lassen. Diese Reaktion fand in einem abgedunkelten Behälter statt. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem 1 M Schwefelsäure in jedes Well gegeben wurde. Nun konnte man eine End-point Messung mittels eines ELISA-Readers bei 450 nm vornehmen.

2.4.5 Myeloperoxidase Aktivitäts-Assay

Die Lunge wurde entnommen, in Flüssig-Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

Zu Beginn des Tests wurden die tiefgefrorenen Lungen auf Eis aufgetaut und ihr Gewicht bestimmt. Zu je 50 mg Lunge wurde 1 ml HTAB-Puffer gegeben. Anschließend wurde die Lunge mit einem Homogenisator zerkleinert. Dies wurde mittels einer Pipette gut vermischt, 1 ml abgenommen, in ein Eppendorf-Cup gegeben und bei 4 °C, 4 min und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in einen weiteren Cup gefüllt. Diese Vorgänge fanden sämtlich auf Eis statt.

Als nächster Schritt wurden 200 µl der o-Dianisidin-Lösung sowie 7 µl der Probe in ein well einer 96-well Mikroplatte gegeben. Dies führte zu einem Farbumschlag, der mittels einer kinetischen Messung bei 450 nm ermittelt wurde.

Der nun erhaltene mOD-Wert/min wurde mit 0,2528 multipliziert, um die MPO-Werte/mg Gewebe zu erhalten [Andonegui et al. 2003]. Zur Erstellung der Tabelle wurden die Werte in MPO-Werte/g Gewebe umgerechnet [Bauer et al. 2000].

2.4.6 Proteinbestimmung in der BAL

Die Bestimmung des Proteingehaltes in der BAL erfolgte gemäß dem BIORAD-Protokoll. Als Standard wurde Bovines Serumalbumin (BSA) in einer Verdünnungsreihe verwendet. Nun legte man 5 µl Probenvolumen in ein well vor und fügte 25 µl Lösung A zu jeder Probe und zu jedem Standard hinzu. Dann wurden 200 µl Reagenz B auf alle Proben und den Standard pipettiert, um den gewünschten Farbumschlag zu erhalten. Die so pipettierte Mikrotiterplatte wurde abgedunkelt und für 3 min gerüttelt.

Danach wurde die Probe mittels eines ELISA-Readers bei 550 nm photometrisch gemessen.

2.5 Protokoll der Experimente

2.5.1 Gruppeneinteilung

Mäuse in einem Alter von 10 - 15 Wochen bei einem Gewicht von 24 – 26 g wurden für die operativen Eingriffe verwendet.

1. Gruppe: WT (Balb/C) mit NaCl-Infusion mit 0, 1 und 10 µg LPS i.t.
2. Gruppe: WT (Balb/C) mit FO-Infusion mit 0, 1 und 10 µg LPS i.t.
3. Gruppe: WT (Balb/C) mit SO-Infusion mit 0, 1 und 10 µg LPS i.t.

4. Gruppe: PAF-Rezeptor -KO mit NaCl-Infusion mit 0, 1 und 10 µg LPS i.t.
5. Gruppe: PAF-Rezeptor -KO mit FO-Infusion mit 0, 1 und 10 µg LPS i.t.
6. Gruppe: PAF-Rezeptor -KO mit SO-Infusion mit 0, 1 und 10 µg LPS i.t.

7. Gruppe: WT mit PAF-R-Antagonist i.v. mit NaCl-Infusion mit 0, 1 und 10 µg LPS i.t.
8. Gruppe: WT mit PAF-R-Antagonist i.v. mit FO-Infusion mit 0, 1 und 10 µg LPS i.t.
9. Gruppe: WT mit PAF-R-Antagonist i.v. mit SO-Infusion mit 0, 1 und 10 µg LPS i.t.

2.5.2 Zeitverlauf

Die Mäuse wurden am Tag 0 operiert und erhielten zunächst eine Pumpe, die mit steriler Natriumchlorid-Lösung befüllt war. Dies diente dazu, den Mäusen eine Rekonvaleszenz-Phase zu gewähren. Nach 7 Tagen wurde die Pumpe gegen eine neue Pumpe ausgewechselt, die kontinuierlich pro Tag 200 µl Volumen pumpt. Diese war entweder mit NaCl (Kontrollgruppe), Omegaven (FO) oder Lipovenös 10 % (SO) befüllt. Zeitgleich erhielten die Mäuse zusätzlich eine Injektion von 200 µl Heparin mit 10 IE s.c.. Sowohl die Lösung in der Pumpe als auch die Heparin-Injektion erhielten sie über drei Tage.

Am dritten Tag des Pumpenwechsels, also 24 Stunden vor Versuchsende, wurde den Mäusen Endotoxin instilliert. 4 oder 24 Stunden später erfolgte dann das Versuchsende mit Blutentnahme, broncho-alveolären Lavage oder Organentnahme (Abb. 19).

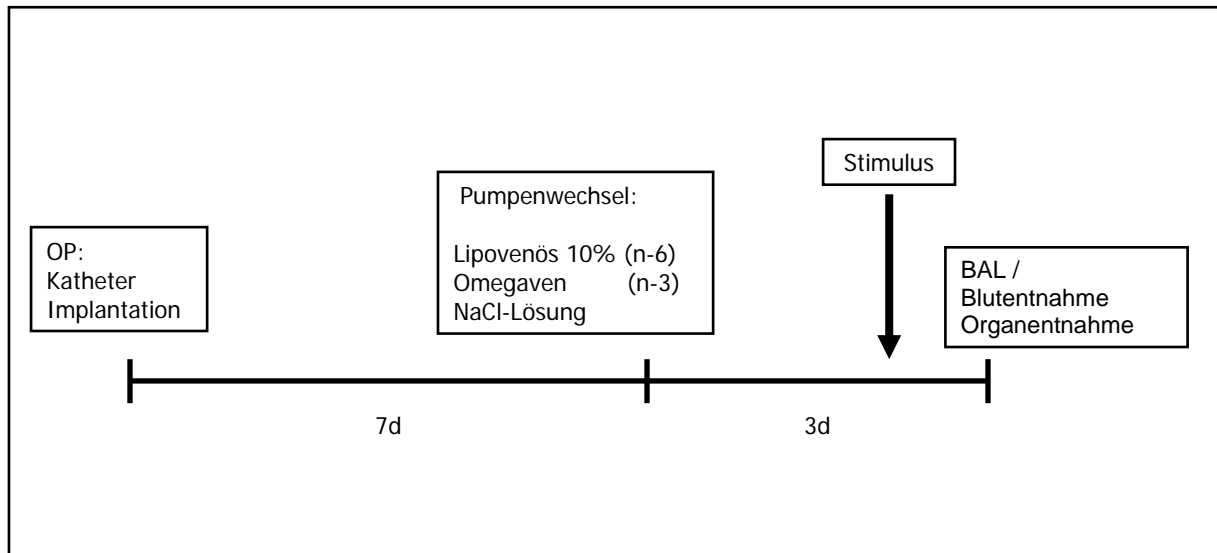


Abbildung 19: Zeitverlauf bei den Versuchen

2.6 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden bei den Tiergruppen die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Eine zwei-faktorielle ANOVA wurde angewendet, um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien und Infusionsgruppen zu testen. Die Student-Newman-Keuls-Methode folgte als post-hoc-Test auf die Varianzanalyse. Als statistisch signifikant wurde eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ angesehen. Die Analyse wurde mit Hilfe des Programms SigmaStat Windows (Release 3.5) berechnet.

Für den Fall, dass die Daten nicht normal-verteilt waren, wurde eine nicht-parametrische ANOVA auf Ränge (on ranks, Kruskal-Wallis) mit nachfolgendem Dunn's-post-hoc-Test durchgeführt (bei Leukozytenzahl in der BAL in der WT-Gruppe bei einer Gabe von $1 \mu\text{g}$ LPS i.t. und Lavage nach 24 Stunden).

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch die Bildung homogener Gruppen.

3 Ergebnisse

3.1 Tierzahlen

Insgesamt gingen die Daten von 913 Mäusen in diese Arbeit ein. Davon waren 639 Mäuse Balb/C (506 Wildtypen und 133 Wildtypen plus PAF-Rezeptor Antagonist BN 52021) und 274 gentechnisch veränderte PAF-Rezeptor-Knock Out-Mäuse.

3.2 Allgemeine Entzündungszeichen

3.2.1 Äußerlich sichtbare Krankheitsanzeichen

Nach Eingabe des Entzündungsstimulus LPS, dem Endotoxin von *E.coli*, konnte man bereits an der Verhaltensweise der Mäuse erkennen, dass sie Krankheitsanzeichen aufwiesen. Die Mäuse saßen, wie auch schon bei *Ishii et al.* beobachtet, zusammengekauert mit gestäubtem Fell in einer Ecke. Die Körperhaltung aller Mäuse zeigte Unwohlsein und ein gestörtes Allgemeinbefinden [Ishii et al. 1997].

3.3 Leukozyteninvasion in die Lunge

Bei den Versuchen wurde eine akute Lungenentzündung ausgelöst. Dafür wurde den Tieren ein Endotoxin intratracheal mit unterschiedlichen Konzentrationen eingegeben. Hierbei kam es u.a. zu einer Transmigration der Leukozyten in den Alveolarraum.

Für alle Versuchsreihen traf zu, dass in den Gruppen, die nicht mit LPS stimuliert wurden und somit als Kontrollgruppen zu allen weiteren dienten, die Lipidinfusionen keinerlei Unterschied in den ermittelten Parametern hervorgerufen hatte.

3.3.1 Alveolarraum

Es wurden die in den Alveolarraum transmigrierten Leukozyten mit Hilfe der broncho-alveolären Lavage bei verschiedenen infundierten Mausgruppen und verschiedenen Mauslinien bei einer akuten Lungenentzündung bestimmt.

3.3.1.1 Ergebnisse der Wildtyp-Mäuse

WT-Mäuse wurden drei Tage lang mit normaler Natriumchloridlösung (Kontrollgruppe), FO oder SO infundiert. Darauf folgte eine Stimulation mit dem Endotoxin in der Konzentration von 1 µg über eine intratracheale Instillation. Eine broncho-alveoläre Lavage wurde 24 Stunden später durchgeführt. In der unstimulierten Lunge wurden $0,10 \pm 0,01 \times 10^6$ Leukozyten in der Lavage-Flüssigkeit gefunden (n=6). Dabei waren keinerlei signifikante Unterschiede in den verschiedenen Infusionsgruppen (NaCl, FO oder SO) erkennbar.

Nach Stimulation mit 1 µg LPS i.t. in der Kontrollgruppe stieg die Anzahl der in den Alveolarraum migrierten und mit Hilfe der broncho-alveolären Lavage nach 24 Stunden gewonnenen Zellen auf $1,09 \pm 0,08 \times 10^6$ Leukozyten (n=10; Abb. 20).

Bei den mit entweder FO oder SO infundierten Gruppen wurden klar unterschiedliche Ergebnisse ermittelt. Die Resultate, die in der Gruppe mit n-3-reichen Lipidemulsionen ermittelt wurden, zeigten eine signifikant verringerte Zellzahl. Bei dem 24 Stunden-Wert nach Stimulation mit 1 µg LPS i.t. wurden $0,63 \pm 0,07 \times 10^6$ Zellen (n=8) in der Lavage gezählt. Im Gegensatz dazu war die Gesamtzellzahl in der Gruppe der mit SO infundierten Mäusen deutlich höher. Hier stieg die Anzahl der transmigrierten Leukozyten auf $2,26 \pm 0,58 \times 10^6$ Zellen (n=11) in der Lavageflüssigkeit.

Die Werte zeigten signifikante Unterschiede zwischen der NaCl-Kontrollgruppe und der FO-Infusionsgruppe und zwischen der FO- und SO-Infusionsgruppe ($p < 0,05$).

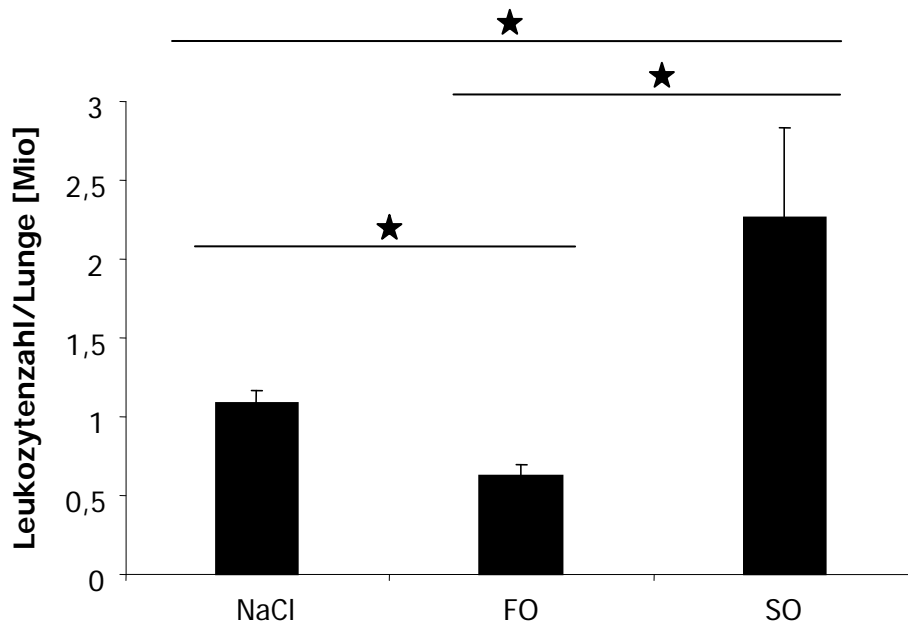


Abbildung 20: Leukozytenanzahl in der BAL bei WT-Tieren nach Stimulation der Lunge mit 1 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden

Dargestellt sind die Ergebnisse für die Leukozytenanzahl in der Lunge bei WT-Mäusen. Man sieht signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Infusionsgruppen. Die Gruppen wurden über drei Tage mit unterschiedlichen Infusionslösungen infundiert. Danach wurden sie mit 1 µg LPS i.t. stimuliert. Die broncho-alveoläre Lavage fand 24 Stunden später statt. Signifikanz (*) liegt je bei $p < 0,05$; dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n=6-11$.

Eine weitere Gruppe von WT-Mäusen wurde nun zum Vergleich mit 10 µg LPS i.t. stimuliert und die BAL fand erneut 24 Stunden später statt. Hierbei sah man im Vergleich zur Gruppe, die 1 µg LPS i.t. erhielt, einen deutlichen Anstieg der Zellzahl in der Lavage (Abb. 21).

Bei Mäusen, denen NaCl infundiert wurde, stieg der ermittelte Wert auf $2,83 \pm 0,06 \times 10^6$ Zellen ($n=6$). Im Vergleich dazu wurden bei den Mäusen, denen die n-3-reiche Lipidemulsion infundiert wurde, $2,44 \pm 0,19 \times 10^6$ Leukozyten ($n=5$) in der Lavageflüssigkeit gezählt. In der Gruppe der mit SO infundierten Mäuse stieg die Zahl der emigrierten Leukozyten auf $3,05 \pm 0,09 \times 10^6$ ($n=4$).

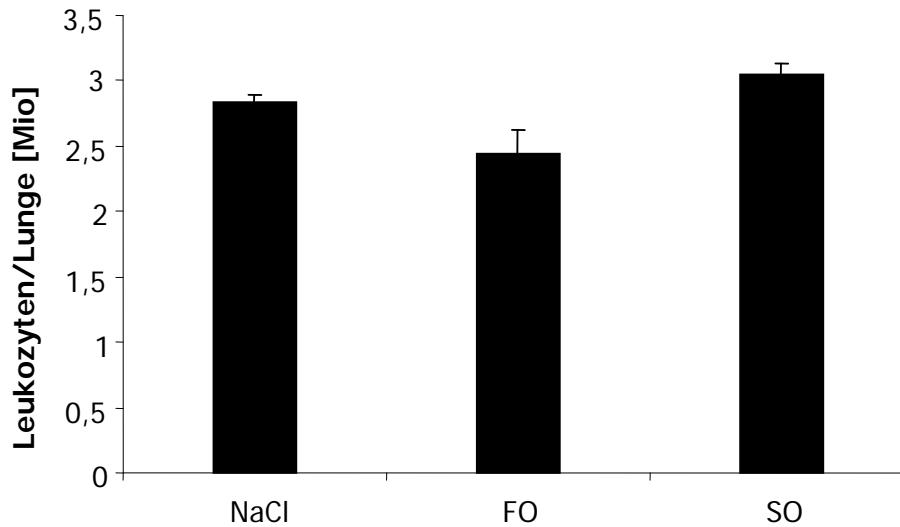


Abbildung 21: Leukozytenanzahl in der BAL bei WT-Tieren nach Stimulation der Lunge mit 10 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden

Dargestellt sind die Ergebnisse für die Leukozytenanzahl in der Lunge bei WT-Mäusen in der Lunge bei 10 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden und verschiedenen Infusionen. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Infusionsgruppen sind nicht sichtbar. Die Gruppen wurden über drei Tage mit NaCl, FO oder SO infundiert. Dann wurden sie mit 10 µg LPS i.t. stimuliert. Die broncho-alveoläre Lavage fand 24 Stunden später statt. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=4-6.

Um den Zeitverlauf einer Leukozytenemigration in die Lungenalveolen zu beurteilen, wurden WT-Mäuse mit NaCl infundiert und mit 10 µg LPS i.t. stimuliert. In diesem Versuch wurden sie aber schon nach 4 Stunden lavagiert und die Leukozytenzahl in den Alveolen bestimmt. Hierbei wurden $0,76 \pm 0,04 \times 10^6$ Zellen (n=9) gezählt. Erkennbar ist, dass die Anzahl der Leukozyten nach 4 Stunden erheblich geringer ist im Vergleich zur Anzahl der Zellen nach 24 Stunden (Abb. 22). Bei diesen Werten sieht man, dass die Leukozyten noch bis 24 Stunden nach Gabe des Endotoxins massiv in die Alveolen emigrieren.

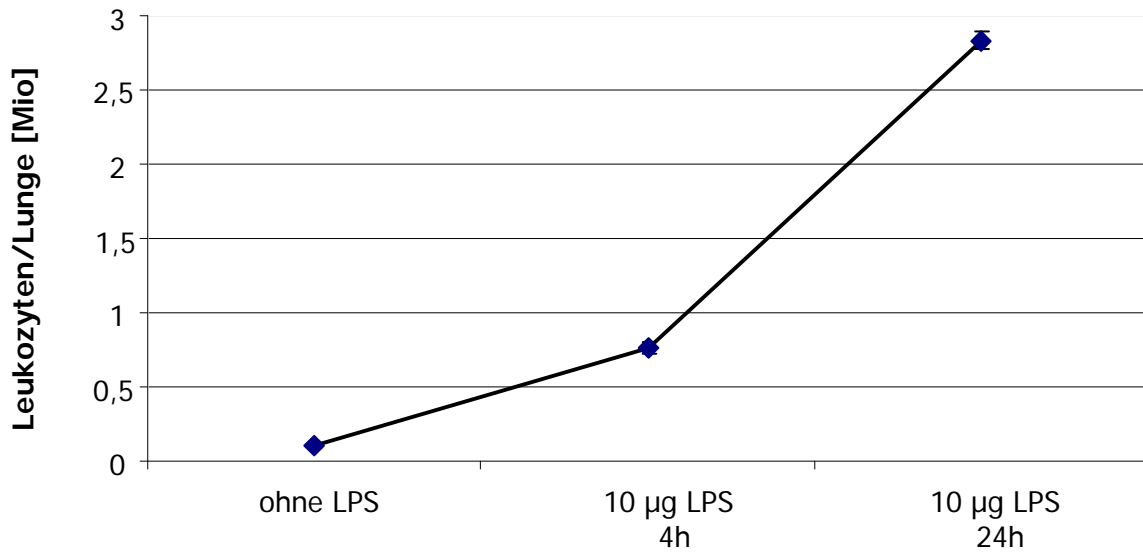


Abbildung 22: Transmigration der Leukozyten in den Alveolarraum im Zeitverlauf
Stimuliert wurden NaCl-infundierte Mäuse mit 10 µg LPS i.t., bzw. 0,9% NaCl als Trägerstoff, und sie wurden nach 4 bzw. 24 Stunden lavagiert und die Leukozyten gezählt. Dargestellt sind MW ± SEM; n=6-9.

Es lässt sich erkennen, dass die Leukozyten über einen längeren Zeitraum – hier 24 Stunden – in die Lungenalveolen einwandern.

Die Differenzierung der in der Lavage gefundenen Zellen ergab in der unstimulierten Gruppe $97,0 \% \pm 0,9$ Monozyten/Makrophagen, $2,5 \% \pm 0,8$ Granulozyten und $0,5 \% \pm 0,3$ Lymphozyten (Abb. 23). Nach Stimulierung mit LPS kam es zu einer Emigration von Granulozyten, die sich in der Verschiebung der Verhältnisse spiegelt. Jetzt setzte sich die Zellzahl der gefundenen Leukozyten aus $78,0 \% \pm 3,2$ Granulozyten, $20,0 \% \pm 3,1$ Monozyten/Makrophagen und $2,0 \% \pm 0,4$ Lymphozyten zusammen.

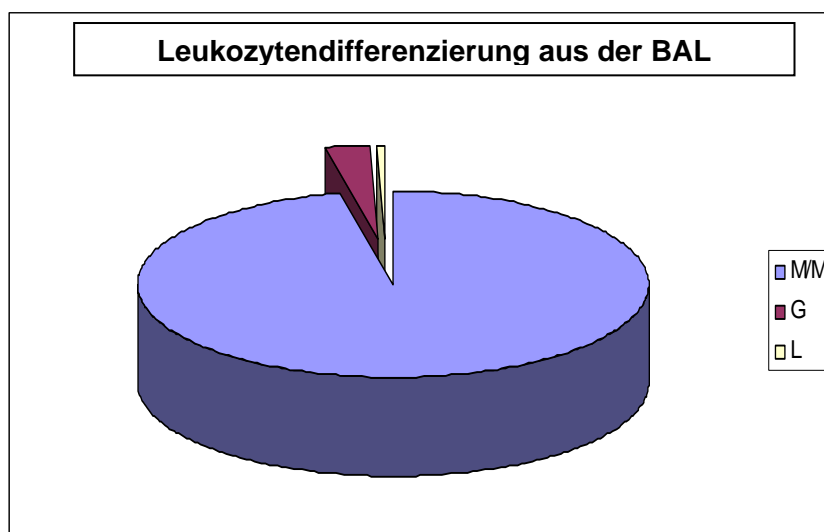


Abbildung 23: Differenzierung der Leukozyten aus der BAL bei unstimulierten Tieren

Gezeigt werden die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen im Verhältnis, die sich in der BAL unstimulierter Mäuse befinden. M/M steht für Monozyten/Makrophagen, G entspricht der Granulozyten-Population und L steht für Lymphozyten. Dargestellt ist der Mittelwert aus 6 unterschiedlichen Lavagen.

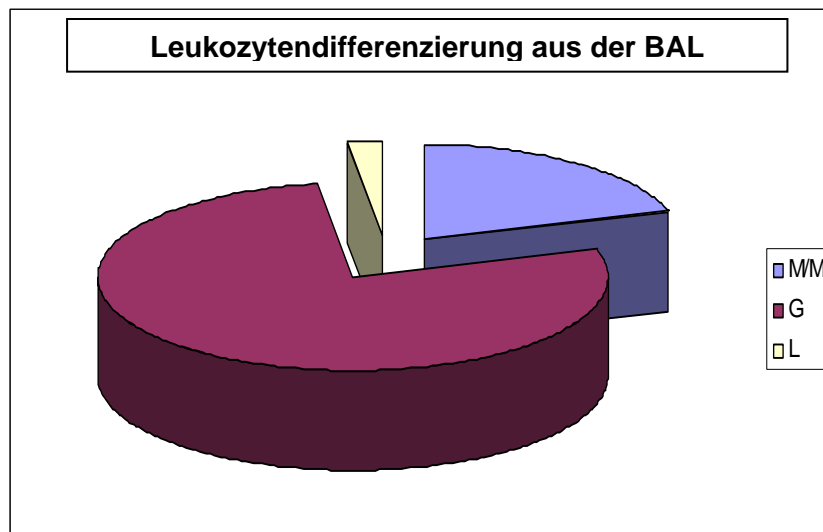


Abbildung 24: Differenzierung der Leukozyten aus der BAL bei Tieren, die mit 1 µg LPS intratracheal stimuliert wurden

Gezeigt werden die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen im Verhältnis, die sich in der BAL von Mäusen befinden, die mit 1 µg LPS intratracheal stimuliert wurden. Die Lavage fand 24 Stunden später statt. M/M steht für Monozyten/Makrophagen, G entspricht der Granulozyten-Population und L steht für Lymphozyten. Dargestellt ist der Mittelwert aus 10 unterschiedlichen Lavagen.

Dieses Profil blieb in sämtlichen unterschiedlichen Infusionsgruppen nach einer Stimulation mit LPS unverändert (Abb. 24).

3.3.1.2 Ergebnisse der PAF-Rezeptor-Knock Out-Mäuse

Die Leukozytenanzahl in der Lavageflüssigkeit und auch die Zelldifferenzierung in der broncho-alveolären Lavage nach intratrachealen Stimulation mit LPS bei den PAF-Rezeptor-KO-Mäusen, die mit Kochsalzlösung infundiert wurden, zeigten eine ähnliche Reaktion wie bei ihren korrespondierenden Wildtyp-Mäusen. Es bestand keinerlei Unterschied in der Quantität der transmigrierten Leukozyten in den Alveolarraum und in der Verteilung der Leukozytenpopulationen zwischen den beiden Mauslinien.

Der divergierende Effekt, der nach der Infusion der Lipidemulsionen in der Transmigration der Leukozyten in den WT-Mäusen beobachtet wurde, zeigte sich bei den PAF-Rezeptor-KO-Mäusen nicht mehr (Abb. 25). In beiden Gruppen, denen

Lipidemulsionen infundiert wurden, war die Anzahl der transmigrierten Leukozyten zwar geringfügig unterschiedlich, aber nicht mehr statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, der NaCl-Lösung infundiert wurde. Die unterschiedliche LPS-Konzentration und auch der Zeitpunkt der Lavage änderte nichts an den Ergebnissen. Bei den Mäusen, die mit 1 µg LPS i.t. stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert wurden, lag in der NaCl-Gruppe die Anzahl der transmigrierten Leukozyten bei $0,87 \pm 0,08 \times 10^6$ (n=8). In der FO-Infusionsgruppe sank die Zellzahl der Leukozyten in der BAL auf $0,64 \pm 0,09 \times 10^6$ (n=9), und bei den mit der n-6-reichen Infusion infundierten Mäusen wurden nach 24 Stunden und Stimulation mit 1 µg LPS $0,59 \pm 0,07 \times 10^6$ Leukozyten (n=7) in der BAL gezählt. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant.

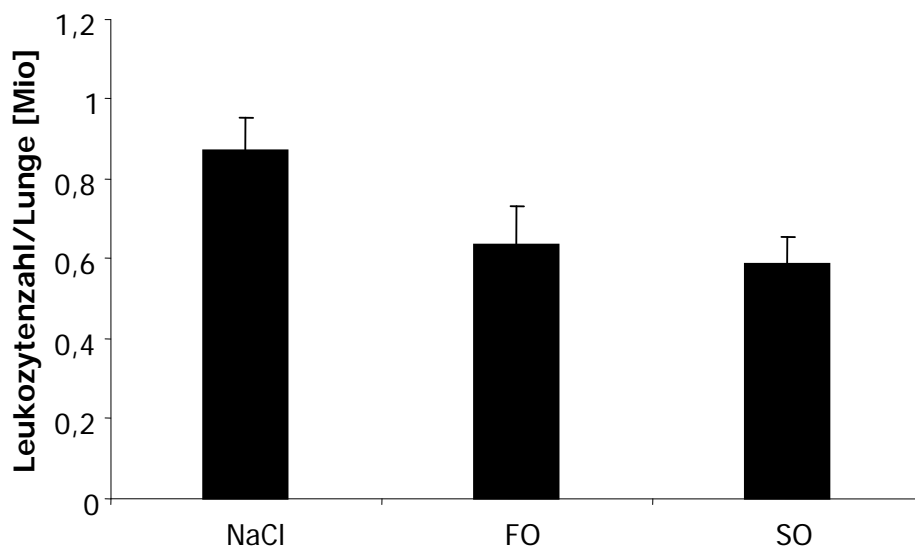


Abbildung 25: Leukozytenanzahl in der BAL bei PAF-R-KO-Tieren nach Stimulation der Lunge mit 1 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden

Gezeigt werden die in den Alveolarraum transmigrierten Leukozyten bei den PAF-Rezeptor-Knock Out-Mäusen nach intratrachealer Stimulation mit 1 µg LPS. Die Lavage fand 24 Stunden später statt. Die Tiere wurden vorher entweder mit NaCl, FO oder SO infundiert. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=7-9.

Eine weitere Gruppe von PAF-R-KO-Mäusen wurde, um das Ausmaß einer akuten Lungenschädigung besser zu definieren, mit 10 µg LPS i.t. stimuliert und 24 Stunden später lavagiert (Abb. 26).

Hierbei ergab sich, dass in der NaCl-Gruppe $2,20 \pm 0,33 \times 10^6$ Leukozyten ($n=5$) aus dem Gefäßbett in den Alveolarraum transmigrierten. In der FO-Infusionsgruppe wurden $2,00 \pm 0,21 \times 10^6$ Leukozyten ($n=4$) in der BAL gefunden. In der Gruppe, denen SO infundiert wurde, wurden $2,23 \pm 0,35 \times 10^6$ Leukozyten ($n=4$) in der Lavage ermittelt. Diese Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede.

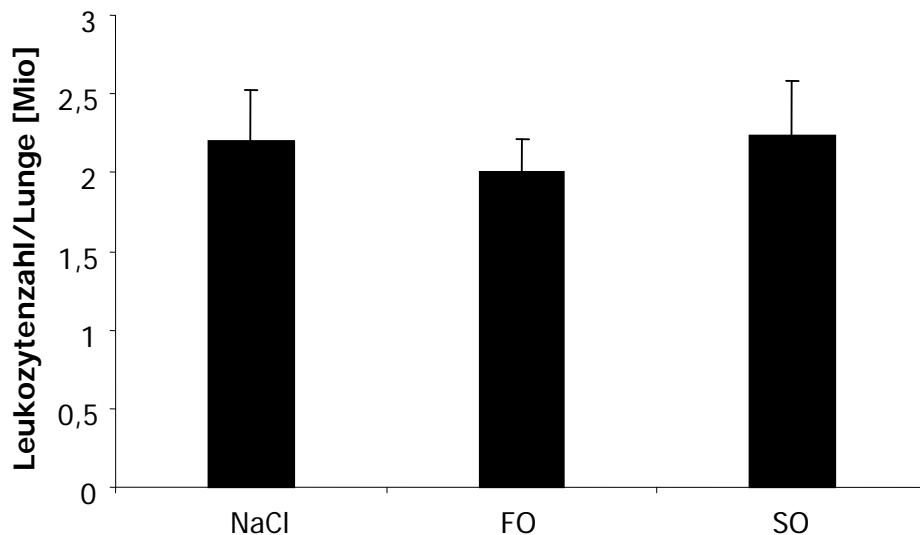


Abbildung 26: Leukozytenanzahl in der BAL bei PAF-R-KO-Tieren nach Stimulation der Lunge mit $10 \mu\text{g}$ LPS i.t., BAL nach 24 Stunden

Gezeigt werden die in den Alveolarraum transmigrierten Leukozyten bei den PAF-Rezeptor-Knock Out-Mäusen nach intratrachealer Stimulation mit $10 \mu\text{g}$ LPS. Die Lavage fand 24 Stunden später statt. Die Tiere wurden vorher entweder mit NaCl, FO oder SO infundiert. Dargestellt sind $\text{MW} \pm \text{SEM}$; $n=4-5$.

3.3.1.3 Ergebnisse der WT plus PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021

Um die bei den PAF-Rezeptor-KO-Mäusen gefundenen Ergebnisse zu bestätigen, wurden Wildtyp-Mäuse mit dem spezifischen PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021 behandelt.

WT-Mäuse wurden über drei Tage entweder mit Natriumchloridlösung, FO oder SO infundiert. Daraufhin wurden sie mit $1 \mu\text{g}$ bzw. $10 \mu\text{g}$ LPS intratracheal stimuliert, bevor nach 24 h eine broncho-alveoläre Lavage vorgenommen wurde. Eine Dosis von 10 mg/kg KG des Rezeptor-Antagonisten BN 52021 wurde ihnen 30 min vor Eingabe des LPS in die laterale Schwanzvene injiziert.

Die Anzahl der in den Alveolarraum transmigrierten Zellen in der NaCl-Infusionsgruppe und bei einer Stimulation mit $1 \mu\text{g}$ LPS i.t. lag bei $1,03 \pm 0,05 \times 10^6$ Leukozyten/Lavage ($n=7$; Abb. 27). Damit unterschied sich die Leukozytenanzahl in der Lavage nicht von der Anzahl der Leukozyten, die bei den WT-Mäusen oder den PAF-R-KO-Mäusen bei dieser Stimulation mit $1 \mu\text{g}$ LPS gefunden worden war.

Wie schon bei den PAF-Rezeptor-KO-Mäusen gezeigt werden konnte, modulierten die Fettsäureinfusionen auch hier bei den vorbehandelten Mäusen mit dem Rezeptor-Antagonisten die Anzahl der transmigrierten Leukozyten nicht mehr. Bei den FO-infundierten Mäusen lag die Anzahl der transmigrierten Leukozyten bei $1 \mu\text{g}$ LPS i.t. und die BAL nach 24 Stunden bei $0,77 \pm 0,10 \times 10^6$ ($n=4$), während bei den SO-infundierten Mäusen diese Zahl $1,13 \pm 0,02 \times 10^6$ ($n=4$) betrug. Besonders im Vergleich zu den SO-infundierten WT-Mäusen zeigte diese Fettsäure nicht mehr ihre Fähigkeit, die Anzahl der transmigrierten Zellen zu erhöhen.

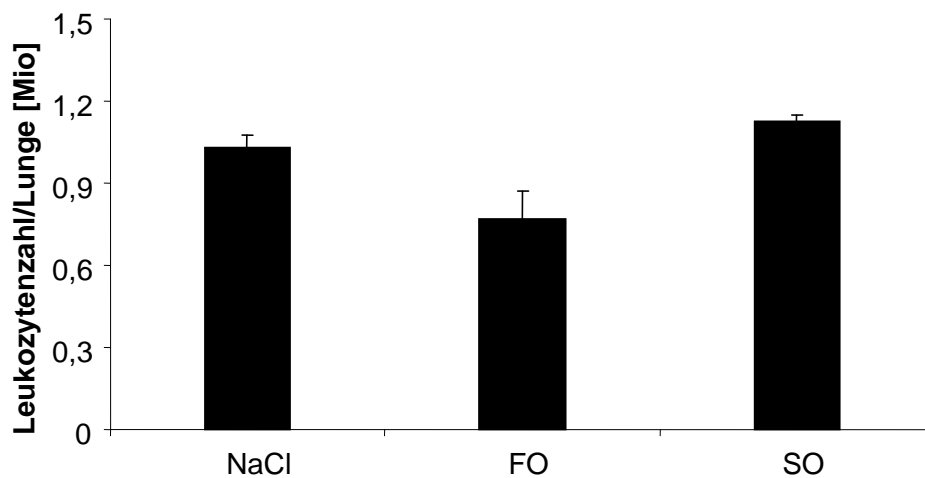


Abbildung 27: Leukozytenanzahl in der BAL bei PAF-RA-Tieren infolge Stimulation der Lunge mit $1 \mu\text{g}$ LPS i.t., BAL nach 24 Stunden

Anzahl der in den Alveolarraum transmigrierten Leukozyten nach Stimulation mit $1 \mu\text{g}$ LPS intratracheal. Kurz vor Gabe des Endotoxins LPS wurden die Mäuse mit dem PAF-R-Antagonisten BN 52021 behandelt. Die Mäuse wurden wie in den vorausgegangenen Experimenten drei Tage lang mit unterschiedlichen Infusionslösungen, NaCl, FO oder SO, infundiert und dann mit LPS stimuliert. Die BAL fand 24 Stunden später statt. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dargestellt sind MW \pm SEM; $n=4-7$.

Um die Effekte des Stimulus in einer höheren Konzentration aufzuzeigen, wurde eine Gruppe von Mäusen wieder mit 10 µg LPS i.t. stimuliert. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurde die BAL erneut 24 Stunden später durchgeführt. Die Anzahl der transmigrierten Leukozyten im Alveolarraum war dabei ähnlich der Anzahl der transmigrierten Zellen bei den WT-Tieren (Abb. 28).

Wurden Mäuse mit NaCl infundiert und anschließend mit 10 µg LPS stimuliert, fand man 24 Stunden später $2,68 \pm 0,15 \times 10^6$ Leukozyten (n=4) in der Lavageflüssigkeit der Kontrollgruppe. In der FO-infundierten Gruppe lag die Anzahl der transmigrierten Zellen bei $2,66 \pm 0,24 \times 10^6$ Leukozyten (n=5), und in der Gruppe, der SO infundiert wurde, waren $2,43 \pm 0,34 \times 10^6$ Leukozyten (n=4) in den Alveolarraum der Lunge transmigriert.

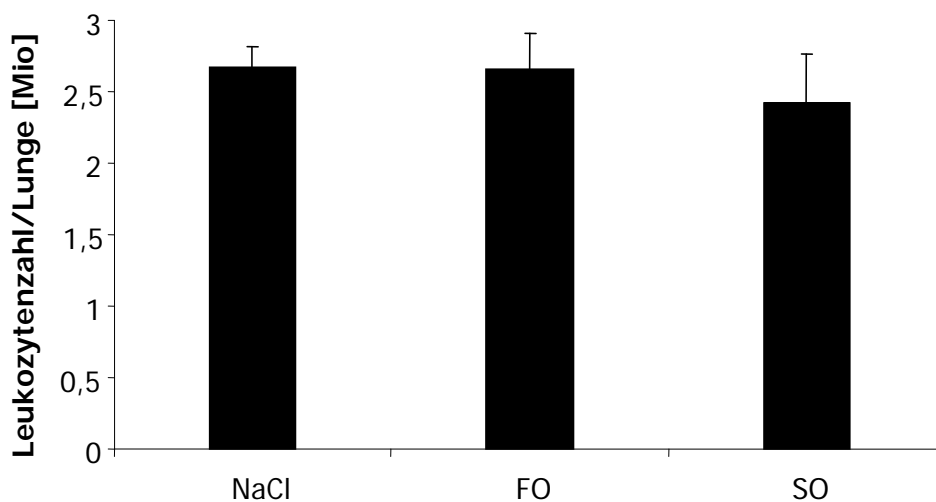


Abbildung 28: Leukozytenanzahl in der BAL bei PAF-RA-Tieren nach Stimulation der Lunge mit 10 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden

Anzahl der in den Alveolarraum transmigrierten Leukozyten nach Stimulation mit 10 µg LPS intratracheal. Kurz vor Gabe des Endotoxins LPS wurden die Mäuse mit dem PAF-R-Antagonisten BN 52021 behandelt. Die Mäuse wurden wie in den vorausgegangenen Experimenten drei Tage lang mit unterschiedlichen Infusionslösungen, NaCl, FO oder SO, infundiert und dann mit LPS stimuliert. Die BAL fand 24 Stunden später statt. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=4-5.

Um die Anzahl der transmigrierten Leukozyten in den Alveolarraum zwischen den Mauslinien zu beurteilen und Unterschiede darzustellen, wurde in der nachfolgenden Grafik (Abb. 29) die Werte der einzelnen Mauslinien gegeneinander gestellt.

Die Mäuse wurden jeweils mit NaCl infundiert. WT wurden mit 1 µg und 10 µg LPS i.t. stimuliert, PAF-R-KO und PAF-RA wurden mit 10 µg LPS i.t. stimuliert.

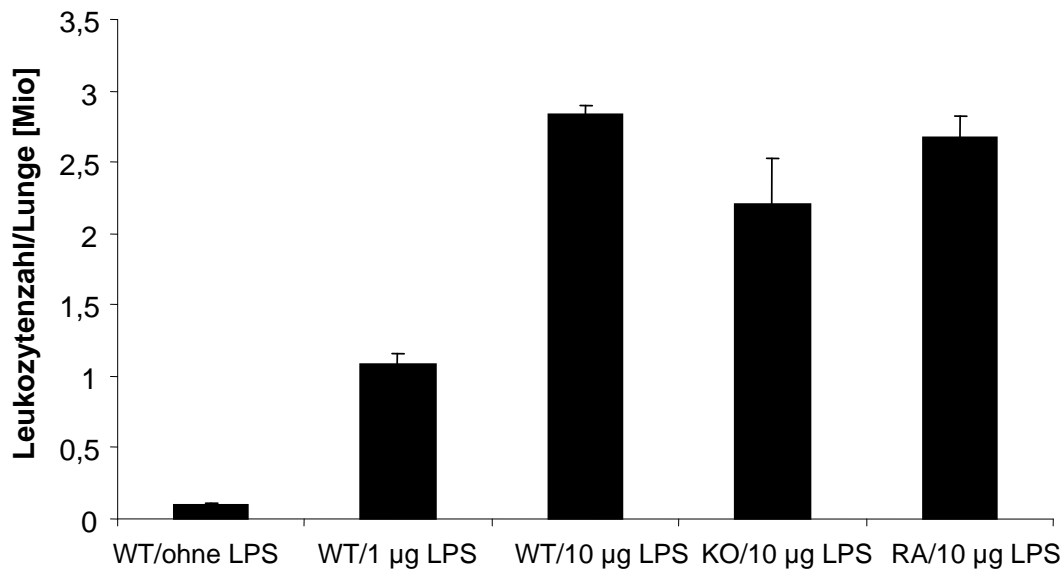


Abbildung 29: Leukozytenanzahl in der BAL bei unterschiedlichen Mauslinien im Vergleich

Vergleich der Leukozytenanzahl innerhalb der unterschiedlichen Mauslinien. Darstellung der ermittelten Werte bei unstimulierten Mäusen und im Vergleich dazu bei mit 1 µg LPS stimulierten WT-Mäusen mit BAL nach 24 Stunden. Die weiteren Werte stammen von WT-, PAF-R-KO- und PAF-RA-Mäusen, die mit 10 µg LPS stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert wurden. Gezeigt werden MW ± SEM; n=5-9.

3.3.2 Interstitium

Die sich im Lungengewebe befindlichen Leukozyten wurden mittels des Myeloperoxidase-Tests bei verschiedenen infundierten Mausgruppen und verschiedenen Mauslinien bei Auslösung einer akuten Lungenentzündung bestimmt.

Bei den entsprechenden Versuchen wurde das Gewebe einer vollständigen Lunge verwendet, um eine kinetische Aktivitätsmessung der leukozytären Myeloperoxidase (MPO) vorzunehmen.

Mit Hilfe des Myeloperoxidase-Tests kann man die freigesetzten Sauerstoffradikale auf Grund eines Farbumschlages bestimmen. Quelle der freigesetzten Sauerstoffradikale in der Lunge sind vorwiegend die Leukozyten. Dadurch können Rückschlüsse auf die Anzahl der im Gewebe vorhandenen Leukozyten gezogen werden.

3.3.2.1 Ergebnisse der WT

Im Lungengewebe der unstimulierten WT-Tiere wurde eine MPO-Aktivität von $0,9 \pm 0,3$ Unit/g ($n=4$) gemessen (Abb. 30). Bei den Mäusen, die $10 \mu\text{g}$ LPS i.t. erhielten und denen die Lunge nach 24 h entnommen wurde, stieg die Konzentration der MPO Lungengewebe auf $6,6 \pm 0,7$ Unit/g ($n=8$) Mäusen. In der Gruppe, die mit FO infundiert wurde, wurden Werte von $6,8 \pm 1,4$ Unit/g ermittelt ($n=4$). Vergleichsweise dazu, stieg die Konzentration in der Gruppe, denen SO infundiert wurden, signifikant auf $11,3 \pm 0,9$ Unit/g Lungengewebe ($n= 4$, $p < 0,05$).

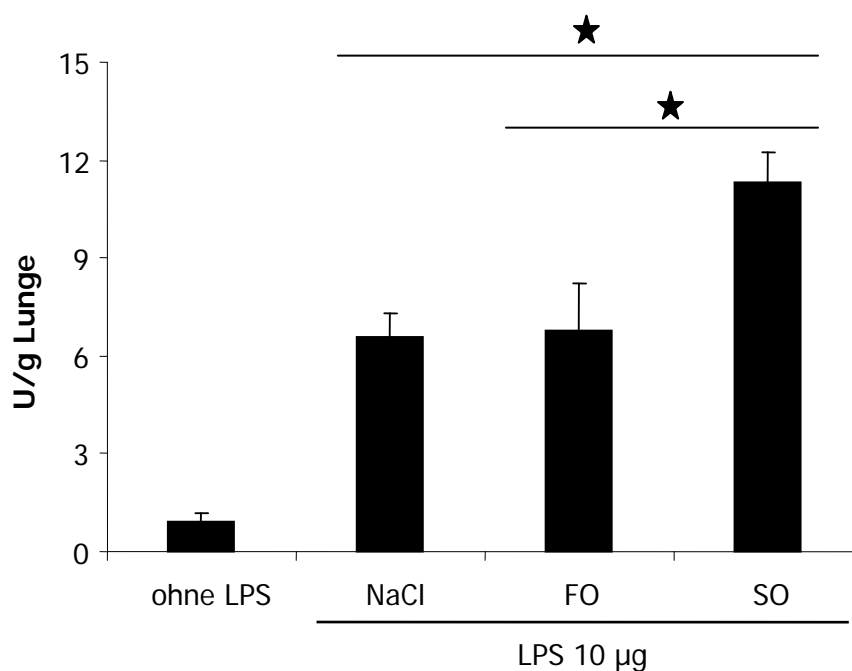


Abbildung 30: MPO-Aktivität im Lungengewebe bei WT-Tieren nach Stimulation der Lunge mit $10 \mu\text{g}$ LPS i.t.

Werte der MPO-Aktivität bei WT-Mäusen, die einmal ohne LPS und einmal mit $10 \mu\text{g}$ LPS i.t. stimuliert wurden. Die Mäuse erhielten drei Tage lang entweder eine NaCl-, FO- oder SO-Infusion, wurden dann mit NaCl, als Trägerstoff für LPS oder mit LPS stimuliert und die Lunge wurde 24 Stunden später entnommen. *, $p < 0,05$, aufgetragen sind $MW \pm SEM$; $n=4-8$.

Bei der Instillation von 1 µg LPS i.t. wurde ein ähnlicher Trend in den ermittelten MPO-Werten gefunden, aber die Ergebnisse erreichten das Signifikanzniveau nicht (Abb. 31). In der NaCl-Kontrollgruppe lag der Wert nach einer Stimulation der Lunge mit 1 µg LPS i.t. bei $3,3 \pm 0,7$ Unit/g Lunge (n=4). Bei den Mäusen, denen eine n-3-reiche Lipidemulsion infundiert wurde, konnte ein Wert von $3,4 \pm 0,4$ Unit/g Lunge (n=4) ermittelt werden. Die SO Infusionsgruppe zeigte einen MPO-Wert von $5,1 \pm 0,9$ Unit/g Lunge (n=4).

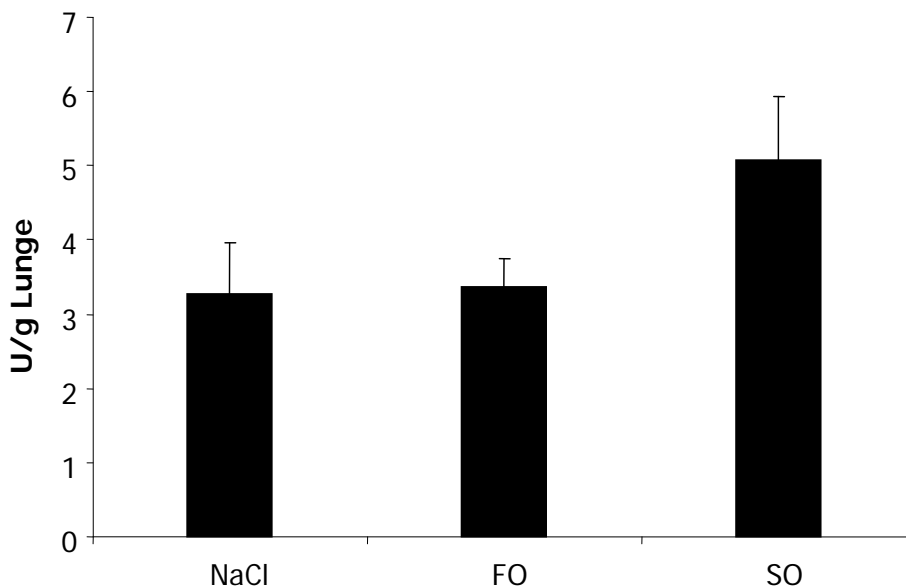


Abbildung 31: MPO-Aktivität im Lungengewebe bei WT-Tieren nach Stimulation der Lunge mit 1 µg LPS i.t.

Werte der MPO-Aktivität bei WT-Mäusen, die mit 1 µg LPS i.t. stimuliert wurden. Die Mäuse erhielten über drei Tage entweder eine NaCl-, FO-, oder SO-Infusion, wurden dann mit LPS stimuliert und die Lunge wurde nach 24 Stunden entnommen. Zwischen den einzelnen Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=4.

3.3.2.2 Ergebnisse der PAF-R-KO-Mäuse

In der Mauslinie der PAF-R-KO wurden Ergebnisse ermittelt, die den Werten der WT-Mäuse ähnelten. Da bei den WT-Mäusen bei 1 µg LPS i.t. keine signifikanten Unterschiede in der Myeloperoxidase Aktivität festgestellt wurden, wurde bei den PAF-R-KO auf diese Untersuchung verzichtet.

Die Tiere wurden mit der höheren LPS-Konzentration von 10 µg LPS i.t. stimuliert. Die Lungenentnahme fand auch hier 24 Stunden später statt. In der NaCl-Infusionsgruppe wurden Werte von $9,1 \pm 1,0$ Unit/g Lunge (n=4) ermittelt (Abb. 32). Wurden die PAF-R-KO-Mäuse mit FO infundiert, zeigte der Test auf leukozytäre Myeloperoxidase Werte von $9,4 \pm 1,4$ Unit/g Gewebe (n=4). Werte von $7,7 \pm 0,5$ Unit/g Gewebe (n=4) wurden in der Gruppe der SO-infundierten Mausgruppe ermittelt.

Auch bei diesen Experimenten waren die divergierenden Effekte der verschiedenen Lipidemulsionen in den PAF-R-KO-Mäusen nicht mehr nachweisbar.

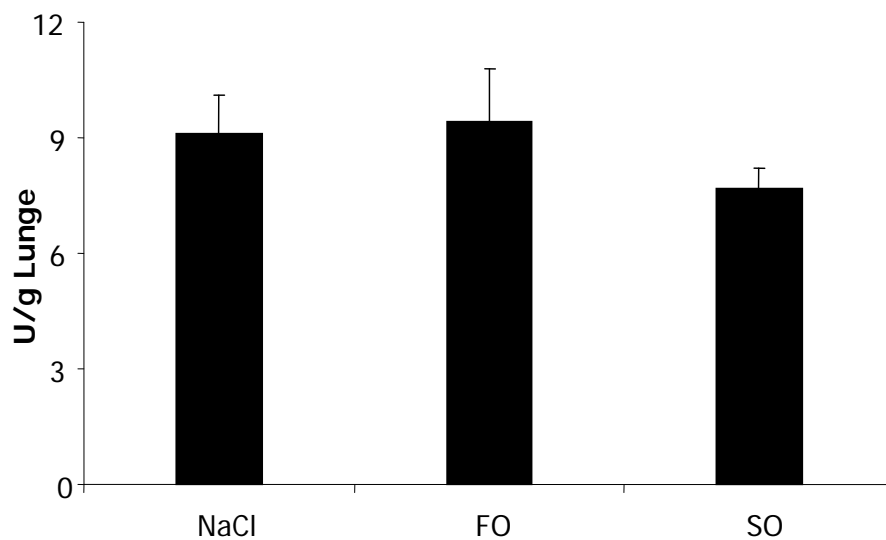


Abbildung 32: Aktivität der MPO bei PAF-R-KO-Mäusen, die mit 10 µg LPS i.t. stimuliert wurden

Werte der MPO-Aktivität bei PAF-R-KO-Mäusen, die mit 10 µg LPS i.t. stimuliert wurden. Die Mäuse erhielten über drei Tage entweder eine NaCl-, FO-, oder SO-Infusion, wurden dann mit LPS stimuliert und die Lunge wurde nach 24 Stunden entnommen. Zwischen den einzelnen Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=4.

3.3.2.3 Ergebnisse der WT plus PAF-RA BN 52021

Diese Gruppe wurde ausgewählt, um die Effekte, die bei den PAF-R-KO-Mäusen ermittelt wurden, zu überprüfen. Den Mäusen wurde 30 min vor intratrachealer Stimulation mit LPS der PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021 in einer Dosierung von 10 mg/kg KG in die laterale Schwanzvene injiziert.

Wiederum wurde hier die Gruppe mit 1 µg LPS i.t. nicht untersucht, sondern mit der höheren LPS-Konzentration von 10 µg LPS i.t. stimuliert, um die Effekte zu ermitteln. Hierbei zeigten die Mäuse, die als Kontrollgruppe dienten und denen sterile NaCl-Lösung infundiert wurde, Werte von $9,5 \pm 1,5$ Unit/g Lungengewebe (n=4; Abb. 33). Einer weiteren Mausgruppe wurde die n-3-reiche Lipidemulsion über 3 Tage infundiert. Bei Testung auf die leukozytäre MPO wurden Werte von $8,3 \pm 0,4$ Unit/g Lunge (n=4) gemessen. In der Gruppe, denen SO infundiert worden war, wurden bei diesem Test $9,6 \pm 1,6$ Unit/g Lunge (n=4) gefunden.

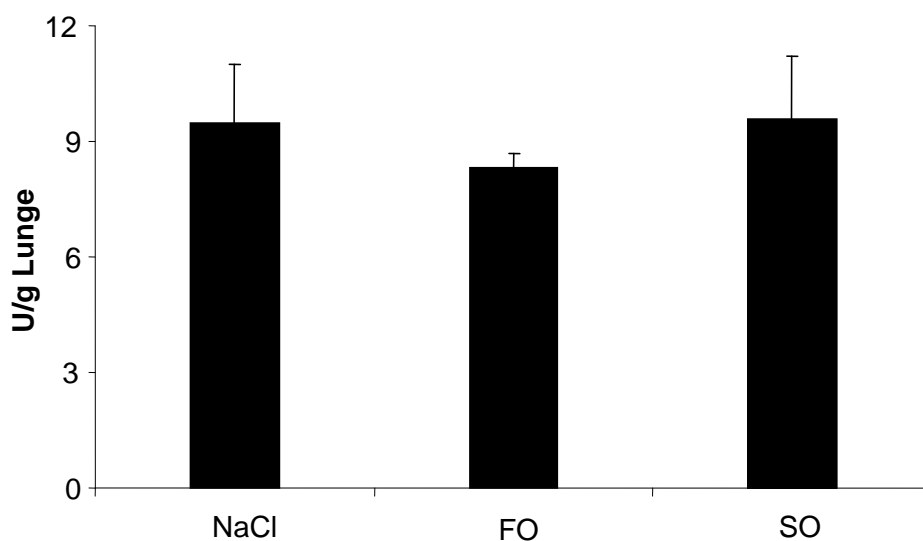


Abbildung 33: MPO-Aktivität bei PAF-RA-Mäusen, die mit 10 µg LPS i.t. stimuliert wurden

Werte der MPO-Aktivität bei PAF-R-KO-Mäusen, die mit 10 µg LPS i.t. stimuliert wurden. Die Mäuse erhielten über drei Tage entweder eine NaCl-, FO-, oder SO-Infusion, wurden dann mit LPS stimuliert und die Lunge wurde nach 24 Stunden entnommen. Zwischen den einzelnen Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=4-8.

Vergleicht man nun die ermittelten Werte des MPO-Assays in der NaCl-Infusionsgruppe der jeweiligen Mauslinie nach einer Stimulation der Lunge mit 10µg LPS i.t., erkennt man, dass die Werte keine signifikanten Unterschiede aufzeigen. Es zeigt sich, dass die LPS-Wirkung auch bei Ausschaltung des PAF-PAF-Rezeptor-Systems besteht (Abb. 34).

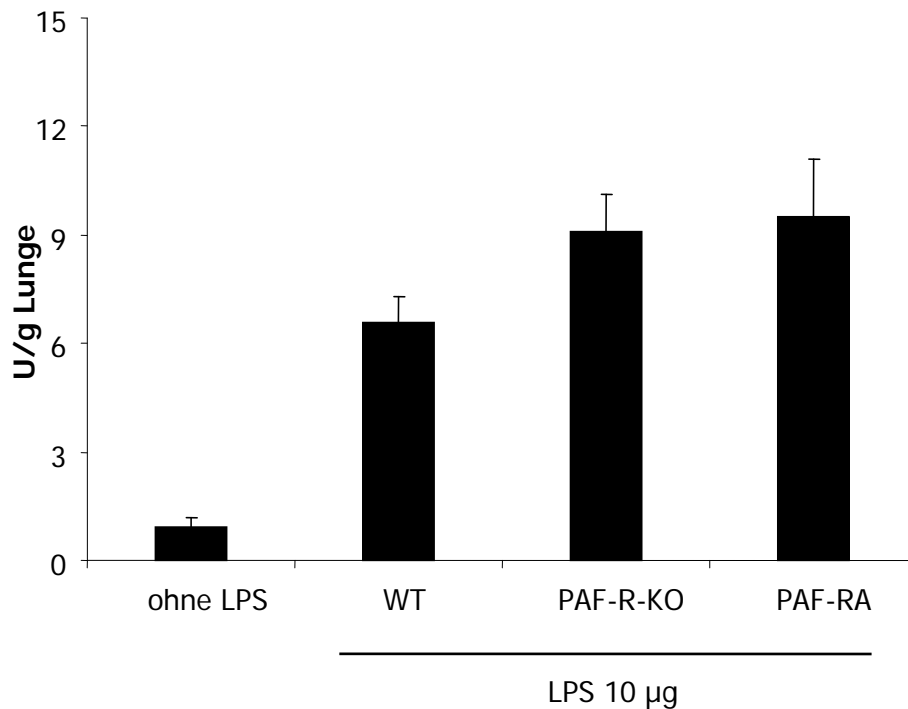


Abbildung 34: Werte der MPO-Aktivität bei den verschiedenen Mauslinien im Vergleich

Die Mäuse erhielten über drei Tage eine NaCl-Infusion. Sie wurden dann mit NaCl, als Trägerstoff für LPS oder mit 10 µg LPS stimuliert und die Lunge wurde 24 Stunden später entnommen. Verglichen wurde die WT-, mit den PAF-R-KO- und den PAF-RA-Mäusen. Zwischen den einzelnen Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Dargestellt sind MW ± SEM; n=4.

3.3.3 Peripheres Blut

Durch die Eingabe des Endotoxins in die Lunge kommt es zu einem massiven Anstieg der Leukozyten in den Lungenalveolen. In den folgenden Experimenten wurden die Leukozytenzahlen im peripheren Blut gemessen, um die Korrelation der Leukozytenzellzahl in der Peripherie zur Anzahl in den Alveolen zu ermitteln. In die

Lunge wurden 10 µg LPS eingegeben und das Blut aus der Vena cava caudalis wurde 24 Stunden später entnommen.

3.3.3.1 Ergebnisse der WT

Bei den WT-Mäusen kann man sehen, dass nach einer Stimulation der Lunge mit LPS auch die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut drastisch abnimmt (Abb. 35). Die Anzahl der Leukozyten sinkt im peripheren Blut der unstimulierten Gruppe von $6,6 \pm 0,3 \times 10^6/\text{ml}$ Leukozyten ($n=5$) auf $3,6 \pm 0,9 \times 10^6/\text{ml}$ Leukozyten ($n=5$) bei stimulierten Mäusen mit NaCl-Infusion und Stimulation mit 10 µg LPS i.t. ($p < 0,05$). In der Mausgruppe, die FO erhalten hat, ist die Zellzahl signifikant höher als bei der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). So liegt hier die Anzahl der Leukozyten bei $8,0 \pm 1,2 \times 10^6/\text{ml}$ Leukozyten ($n=4$). In der SO-infundierten Gruppe sank hingegen die Leukozytenzahl in der Peripherie auf $5,6 \pm 0,8 \times 10^6/\text{ml}$ Leukozyten ($n=9$).

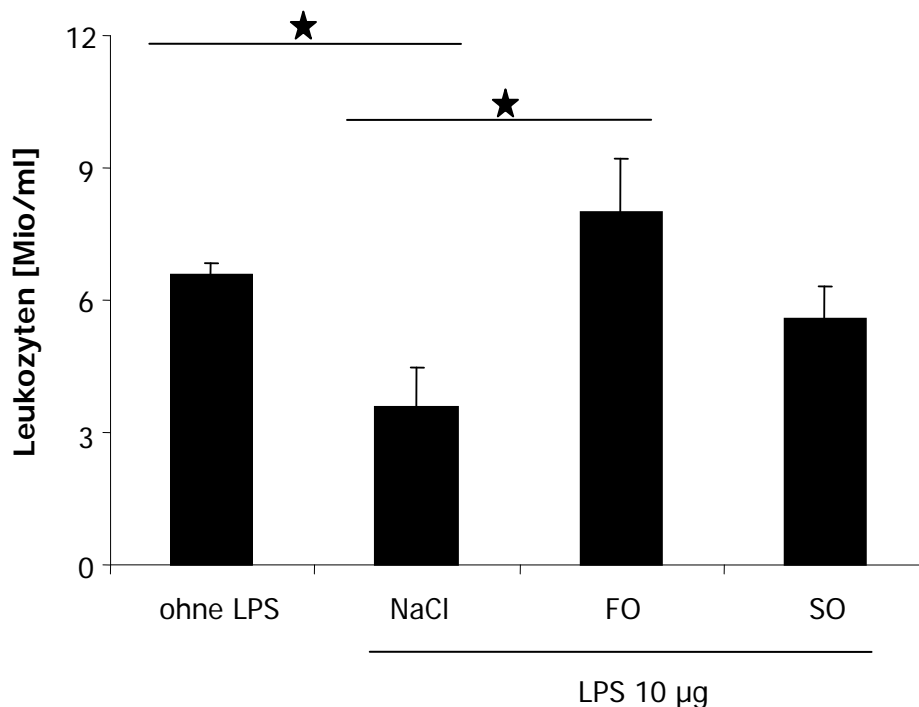


Abbildung 35: Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut bei WT

WT-Mäuse wurden mit NaCl, als Trägerstoff, oder 10 µg LPS i.t. stimuliert und 24 Stunden später wurde Blut aus der V. cava caudalis entnommen. Darin wurde die Anzahl der Leukozyten in der Peripherie bestimmt. Die Mäuse wurden vorher entweder mit NaCl, FO oder SO infundiert. *, $p < 0,05$; dargestellt sind MW \pm SEM; $n=4-9$.

3.3.3.2 Ergebnisse der PAF-R-KO-Mäuse

Den PAF-R-KO-Mäusen wurde 10 µg LPS in die Lunge eingegeben. 24 Stunden später wurde den Mäusen Blut aus der Vena cava caudalis entnommen, um die Leukozytenzahl im peripheren Blut zu bestimmen. Im Gegensatz zur unstimulierten Kontrollgruppe sank auch hier die Zellzahl im peripheren Blut. Hierbei wurden in der NaCl-Gruppe Werte von $5,1 \pm 1,4 \times 10^6/\text{ml}$ Leukozyten im Blut ($n=4$) ermittelt (Abb. 36). Durch die Infusion der verschiedenen Lipidemulsionen konnte bei den PAF-R-KO hingegen keine Modulation der Leukozytenzahl erreicht werden. So wurden bei den Mäusen, denen FO infundiert wurde, eine Leukozytenzahl von $6,6 \pm 1,1 \times 10^6/\text{ml}$ Leukozyten ($n=5$) bestimmt und bei den Mäusen, die SO erhielten, wurden bei gleichem Stimulus und gleichem Zeitpunkt $5,4 \pm 1,1 \times 10^6/\text{ml}$ Leukozyten ($n=5$) im peripheren Blut gemessen. Dies steht zwar im Gegensatz zur WT-Gruppe, stimmt aber mit der Zellzahl in den Lungenalveolen überein. Auch dort findet keine Modulation der Anzahl der Zellen statt und somit kommt es auch nicht zu einer erkennbaren Veränderung der Leukozytenzahl in der Peripherie.

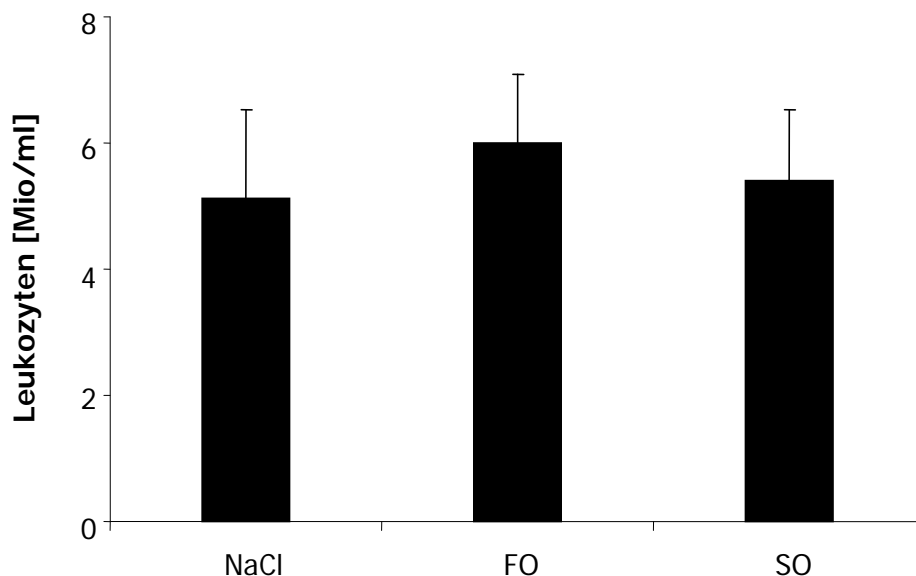


Abbildung 36: Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut bei PAF-R-KO

PAF-R-KO-Mäuse wurden vorher entweder mit NaCl, FO oder SO infundiert. WT-Mäuse wurden mit NaCl, als Trägerstoff, oder 10 µg LPS i.t. stimuliert und 24 Stunden später wurde Blut aus der V. cava caudalis entnommen. Darin wurde die Anzahl der Leukozyten in der Peripherie bestimmt. Die Mäuse wurden vorher entweder mit NaCl, FO oder SO infundiert. Dargestellt sind MW \pm SEM; $n=4-5$.

3.3.3.3 Ergebnisse der WT plus PAF-RA BN 52021

Die Gruppe der WT-Mäuse, der 30 min vor Stimulation mit dem Endotoxin LPS der PAF-R-Antagonisten BN 52021 in die Schwanzvenen injiziert wurde, diente der Überprüfung und Validierung der Ergebnisse der PAF-R-KO-Mäuse. Auch hier wurden 10 µg LPS i.t. eingegeben, 30 min vorher der PAF-R-Antagonist BN 52021 i.v. injiziert und 24 Stunden nach Stimulation mit LPS peripheres Blut aus der Vena cava caudalis entnommen. Hier konnten die Ergebnisse aus der PAF-R-KO-Gruppe bestätigt werden (Abb. 37). Die Zellzahl in der NaCl-Gruppe lag bei $4,8 \pm 1,1 \times 10^6/\text{ml}$ Leukozyten im peripheren Blut ($n=4$) und war somit geringer im Vergleich zur unstimulierten Gruppe. Auch hier wurden die divergierenden Effekte der unterschiedlichen Fettsäuren nicht mehr apparent. In der Gruppe, der FO infundiert wurde, lag die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut bei $5,9 \pm 0,8 \times 10^6/\text{ml}$ Leukozyten ($n=9$). Nach SO-Infusion fand man $4,3 \pm 0,9 \times 10^6/\text{ml}$ Leukozyten im Blut ($n=5$).

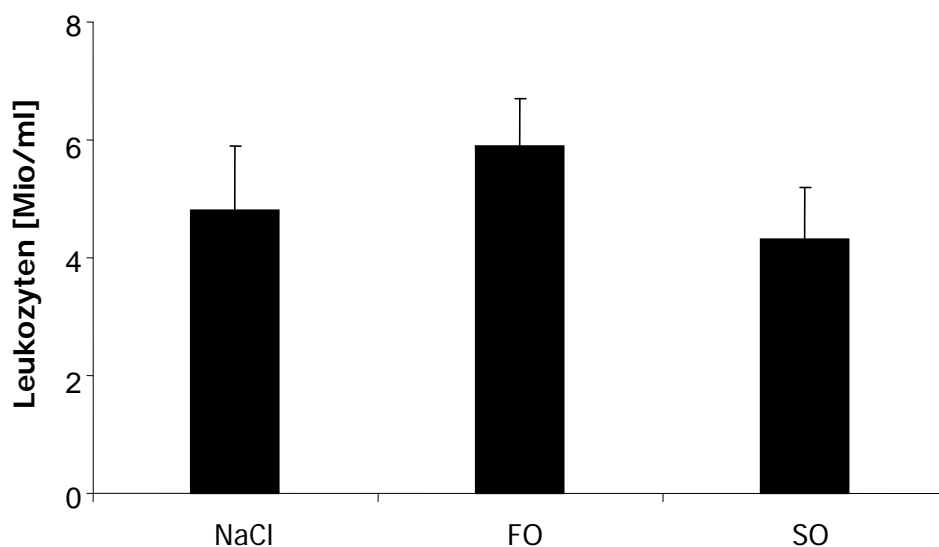


Abbildung 37: Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut bei PAF-RA

PAF-RA-Mäuse wurden mit NaCl, als Trägerstoff, oder 10 µg LPS i.t. stimuliert und 24 Stunden später wurde Blut aus der V. cava caudalis entnommen. Darin wurde die Anzahl der Leukozyten in der Peripherie bestimmt. Die Mäuse wurden vorher entweder mit NaCl, FO oder SO infundiert. Dargestellt sind MW ± SEM; $n=4-9$.

3.4 Permeabilität der endo- / epithelialen Barriere („*vascular leakage*“) der Lungengefäße

3.4.1 Proteingehalt in der broncho-alveolären Lavage

Eine erhöhte Permeabilität durch Schädigung in der endothelialen Barriere und der Lunge führt zu einem erhöhten Proteingehalt in den Lungenalveolen.

3.4.1.1 Ergebnisse der WT

Um den Einfluss der Lipide bei einer Lungenschädigung einschätzen zu können, wurde der Proteingehalt in der Lavageflüssigkeit gemessen.

Nach intratrachealer Eingabe von LPS (1 µg LPS i.t.) in die Lunge und Lavage nach 24 Stunden stieg der Proteingehalt in der Lavageflüssigkeit von 32 ± 3 µg/ml (n=4) in der unstimulierten Gruppe auf 273 ± 16 µg/ml (n=21) bei den stimulierten Tieren (Abb. 38). Im Gegensatz dazu sank der ermittelte Proteingehalt signifikant bei den FO-infundierten Mäusen um 44 % auf 148 ± 21 µg/ml (n=6) bei 1 µg LPS i.t. und Lavage nach 24 Stunden. In der SO-infundierten Gruppe wurde eine Proteinkonzentration von 313 ± 40 µg/ml (n=11) ermittelt, bei Mäusen, die 1 µg LPS i.t. erhielten und 24 Stunden später lavagiert worden waren. Die Signifikanz betrug jeweils $p < 0,01$.

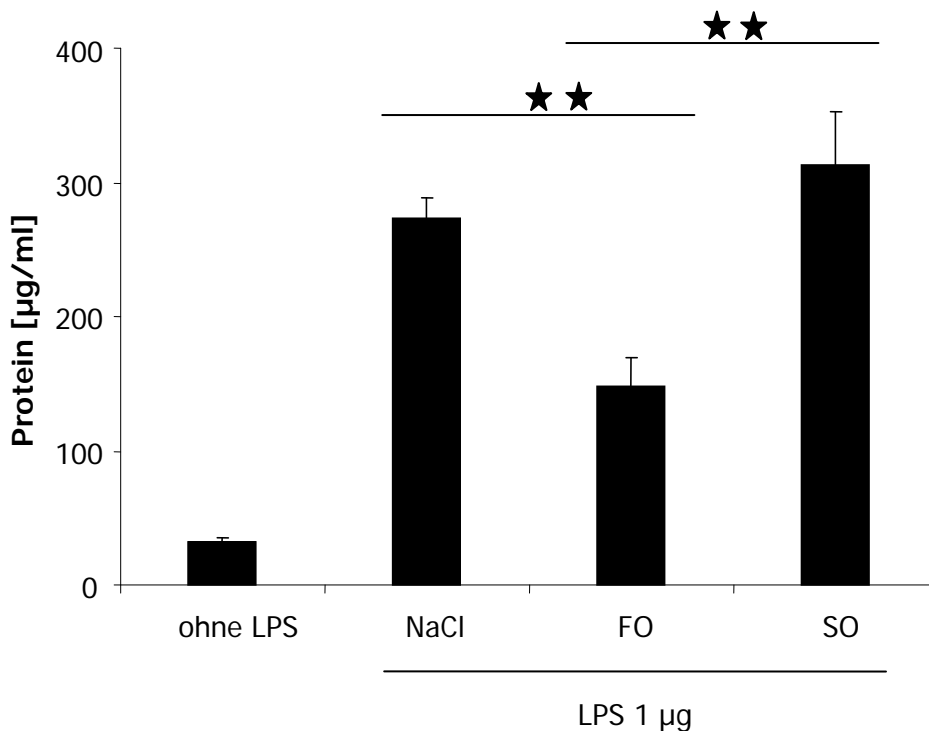


Abbildung 38: Proteinkonzentration in BAL bei 1 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden bei WT-Mäusen

Proteingehalt in der Lavageflüssigkeit bei WT-Mäusen. Die Mäuse wurden entweder mit NaCl als Trägerstoff für LPS oder mit 1 µg LPS i.t. stimuliert. Lavage fand 24 Stunden später statt. Zudem erhielten die Mäuse drei Tage lang entweder eine NaCl-, FO-, oder SO-Infusion. ** entspricht $p < 0,01$; aufgetragen sind $MW \pm SEM$; $n=4-21$.

Des Weiteren wurde die Proteinkonzentration in der Lavage 24 Stunden nach Stimulation der Lunge mit 10 µg LPS gemessen (Abb. 39). Nach der Applikation dieser LPS-Dosis stieg der Wert in der NaCl-Gruppe auf 551 ± 34 µg/ml ($n=4$). Bei den Mäusen mit der FO-Infusion, die 10 µg LPS i.t. erhielten, sanken die Werte der Proteinkonzentration in der Lavageflüssigkeit merklich auf 416 ± 21 µg/ml ($n=5$). Erhielten die mit SO infundierten Mäusen 10 µg LPS i.t., stieg die gemessene Proteinkonzentration sogar signifikant auf 641 ± 11 µg/ml ($n=4$). Der Unterschied in den ermittelten Proteinkonzentrationen der Lavageflüssigkeit zwischen der FO-infundierten und der SO-infundierten Mausgruppe war signifikant ($p < 0.05$) zueinander.

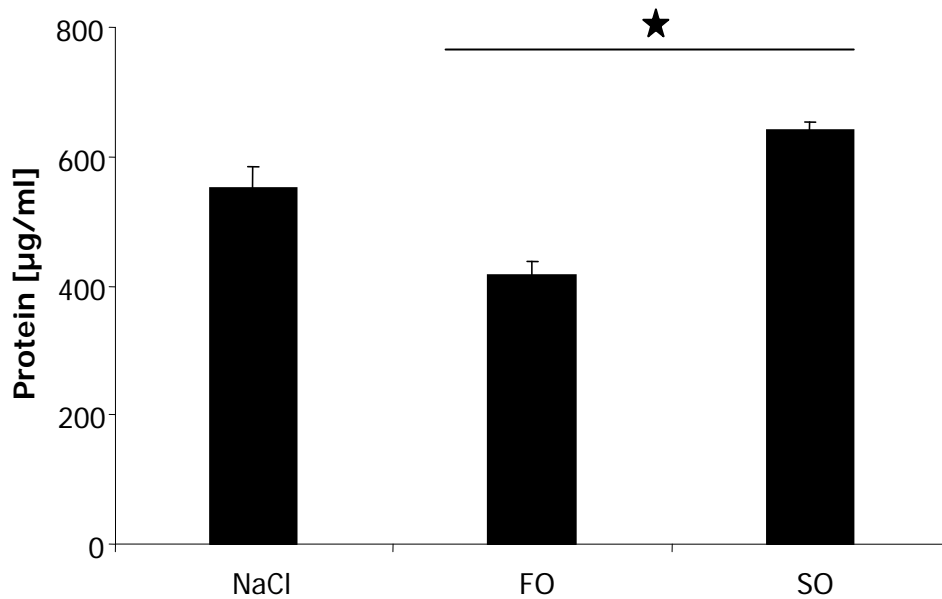


Abbildung 39: Proteinkonzentration in BAL bei 10 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden bei WT-Mäusen

Proteingehalt in der Lavageflüssigkeit bei WT-Mäusen. Die Mäuse wurden entweder mit NaCl als Trägerstoff für LPS oder mit 10 µg LPS i.t. stimuliert. Lavage fand 24 Stunden später statt. Zudem erhielten die Mäuse drei Tage lang entweder eine NaCl-, FO-, oder SO-Infusion.

* entspricht $p < 0,05$; aufgetragen sind $MW \pm SEM$; $n=4-5$.

WT-Mäuse wurden mit steriler NaCl-Lösung infundiert und wieder mit 10 µg LPS i.t. stimuliert. Diesmal wurden sie aber schon nach 4 Stunden lavagiert. Durch den Vergleich dieser beiden Zeitpunkte lässt sich erkennen, dass die in der BAL gemessene Proteinkonzentration im Verlauf mehrerer Stunden lang ansteigt (Abb. 40).

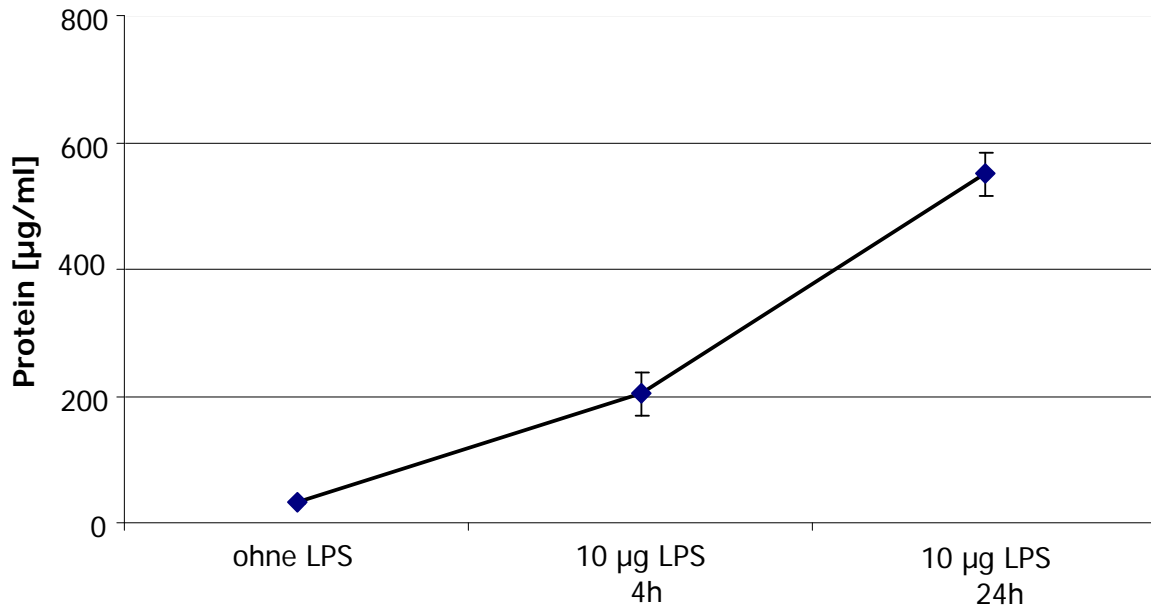


Abbildung 40: Proteinkonzentration in BAL bei 10 μg LPS i.t., Vergleich der unterschiedlichen Lavage-Zeitpunkten bei WT-Mäusen

Stimuliert wurden NaCl-infundierte Mäuse mit 10 μg LPS i.t., bzw. 0,9% NaCl als Trägerstoff, und sie wurden nach 4 bzw. 24 Stunden lavagiert und die Proteinkonzentration gemessen. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=4-21.

3.4.1.2 Ergebnisse der PAF-R-KO-Mäuse

Bei den PAF-Rezeptor-KO-Mäusen war der Proteingehalt in der broncho-alveolären Lavage in der Kontrollgruppe nach Stimulation der Lunge durch intratracheal instilliertes LPS geringfügig höher als im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. In der Kontrollgruppe lag die Proteinkonzentration nach Stimulation mit 1 μg LPS i.t. und Lavage nach 24 Stunden in der BAL bei $347 \pm 36 \mu\text{g/ml}$ (n=11). Die mit Lipidemulsionen infundierten Mäusegruppen zeigten zwar einen reduzierten Proteingehalt in der Lavageflüssigkeit, dieser war aber weder signifikant noch zeigten sich die divergierenden Effekte der Fettsäuren, die bei den WT-Tieren deutlich auffielen (Abb. 41). Unter FO-Infusion wurde eine Konzentration von $338 \pm 69 \mu\text{g/ml}$ (n=9) in der Lavageflüssigkeit gemessen. Bei den Mäusen, die SO erhielten, fanden sich Konzentrationen von $304 \pm 67 \mu\text{g/ml}$ Protein (n=7) in der Lavage.

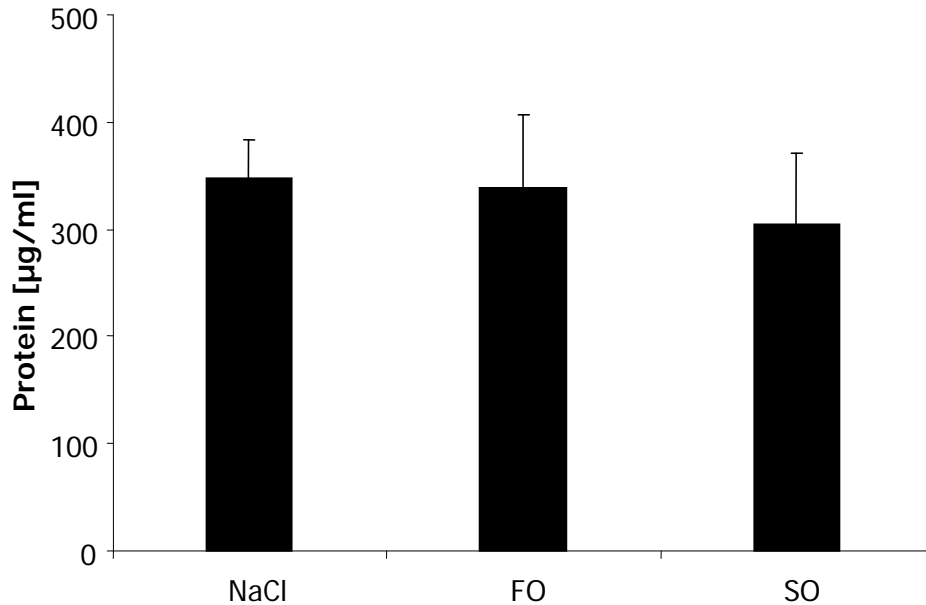


Abbildung 41: Proteinkonzentration in BAL bei 1 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden bei PAF-R-KO-Mäusen

Proteinkonzentration in der Lavageflüssigkeit bei PAF-R-KO-Mäusen. Die Lunge wurde mit 1 µg LPS i.t. stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert. Zugleich erhielten die Mäuse über drei Tage eine NaCl-, FO-, oder SO-Infusion. Dargestellt sind MW ± SEM; n=7-11.

Wiederum wurden Tiere mit einer LPS-Konzentration von 10 µg LPS i.t. stimuliert (Abb. 42).

Die Werte der Proteinkonzentration der Mäuse, die mit NaCl infundiert wurden, lagen bei 382 ± 89 µg/ml (n=6) in der Lavage, die 24 Stunden später durchgeführt wurde.

Die Proteinkonzentration bei den FO-infundierten Mäusen wurde mit 462 ± 43 µg/ml (n=4) ermittelt und bei den SO-infundierten Mäusen wurden Werte von 654 ± 115 µg/ml Protein in der BAL (n=5) gemessen.

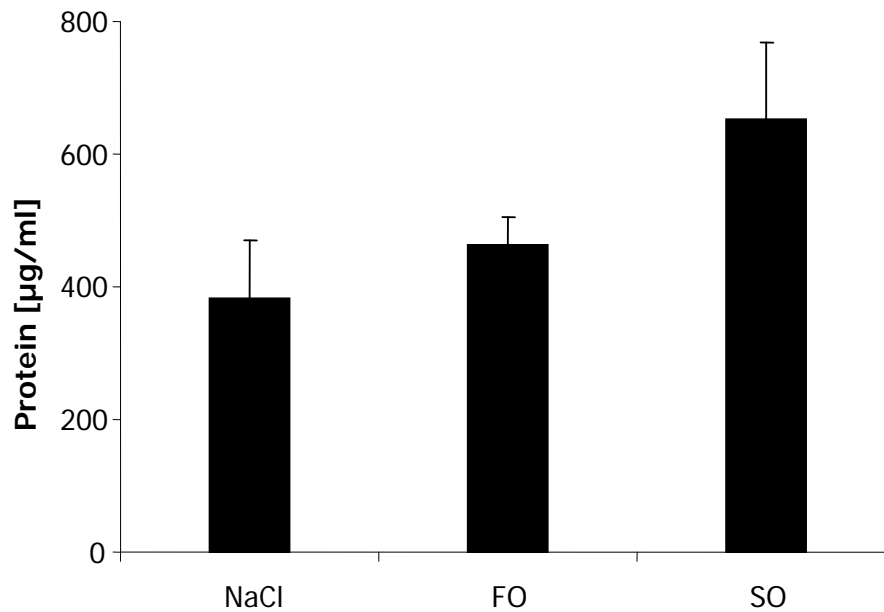


Abbildung 42: Proteinkonzentration in der BAL bei 10 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden bei PAF-R-KO-Mäusen

Proteingehalt in der Lavageflüssigkeit bei PAF-R-KO-Mäusen. Die Mäuse wurden mit 10 µg LPS i.t. stimuliert und die Lavage wurde 24 Stunde später durchgeführt. Parallel dazu erhielten die Mäuse über drei Tage entweder eine NaCl-, FO-, oder SO-Infusion. Dargestellt sind MW ± SEM; n=4-6.

Anhand dieser Werte erkennt man, dass es trotz Unterbrechung des PAF-Rezeptor-Signalweges zu einer erhöhten Proteinextravasation aus den Gefäßen in die Alveolen kommt. Allerdings ist die modulierende Wirkung der Fettsäuren auch bei diesem Test aufgehoben.

3.4.1.3 Ergebnisse der WT plus PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021

Um die ermittelten Ergebnisse der PAF-R-KO-Gruppe zu bestätigen oder zu widerlegen, wurden WT-Tiere genommen, denen der PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021 i.v. injiziert wurde.

Auch hier wurden die Tiere entweder mit NaCl, FO- oder SO-Lipidemulsionen infundiert. Danach wurden sie mit 1 µg respektive 10 µg LPS intratracheal stimuliert. Kurz davor erhielten sie zusätzlich den PAF-Rezeptor-Antagonisten BN 52021, der

ihnen in die Schwanzvene injiziert wurde. Die Lavage der Lunge wurde 24 Stunden nach Instillation des Endotoxins vorgenommen.

Betrachtet man zunächst die Mäuse, die mit 1 µg LPS i.t. stimuliert wurden, erkennt man, dass die Werte sich nicht sonderlich von den WT unterschieden (Abb. 43). Wieder ist auffällig, dass die divergenten Effekte der Lipide nach Gabe des PAF-RA aufgehoben waren. In der NaCl-Infusionsgruppe wurde eine Proteinkonzentration in der BAL von 325 ± 40 µg/ml ($n=4$) ermittelt. Die Werte in der Gruppe, die eine n-3-reiche-Lipidemulsion erhielten, lagen bei 253 ± 50 µg/ml Protein in der BAL ($n=4$). Eine Proteinkonzentration von 331 ± 70 µg/ml ($n=4$) wurde in der Gruppe mit der SO-Infusion gemessen.

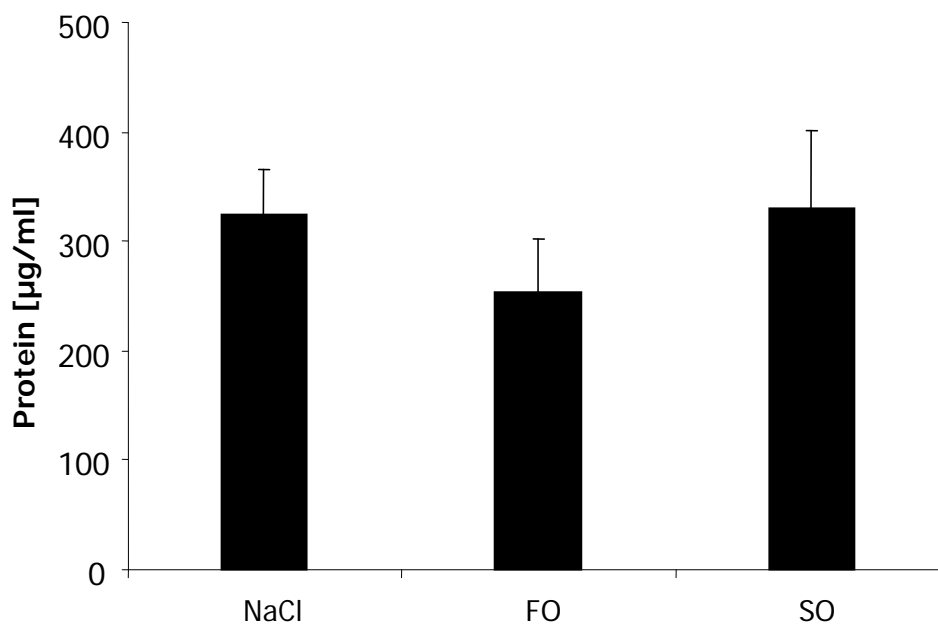


Abbildung 43: Proteinkonzentration in BAL bei 1 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden bei PAF-RA-Mäusen

Proteingehalt in der Lavageflüssigkeit bei PAF-RA-Mäusen. Die Mäuse wurden mit 1 µg LPS i.t. stimuliert und die Lavage wurde 24 Stunde später durchgeführt. Zugleich dazu erhielten die Mäuse über drei Tage entweder eine NaCl-, FO-, oder SO-Infusion. Dargestellt sind MW \pm SEM; $n=4$.

Werden nun die Werte bei einer LPS-Konzentration von 10 µg mit den bereits ermittelten Werten bei 1 µg LPS i.t. verglichen, erkennt man einen deutlichen Anstieg in der NaCl-Gruppe auf 552 ± 86 µg/ml BAL ($n=4$). In der FO-Infusionsgruppe sank

der Wert zwar auf $424 \pm 102 \mu\text{g/ml}$ ($n=6$) in der BAL, dies war aber nicht signifikant. In der SO-Infusionsgruppe wurde eine Proteinkonzentration von $527 \pm 119 \mu\text{g/ml}$ ($n=6$) gemessen (Abb. 44).

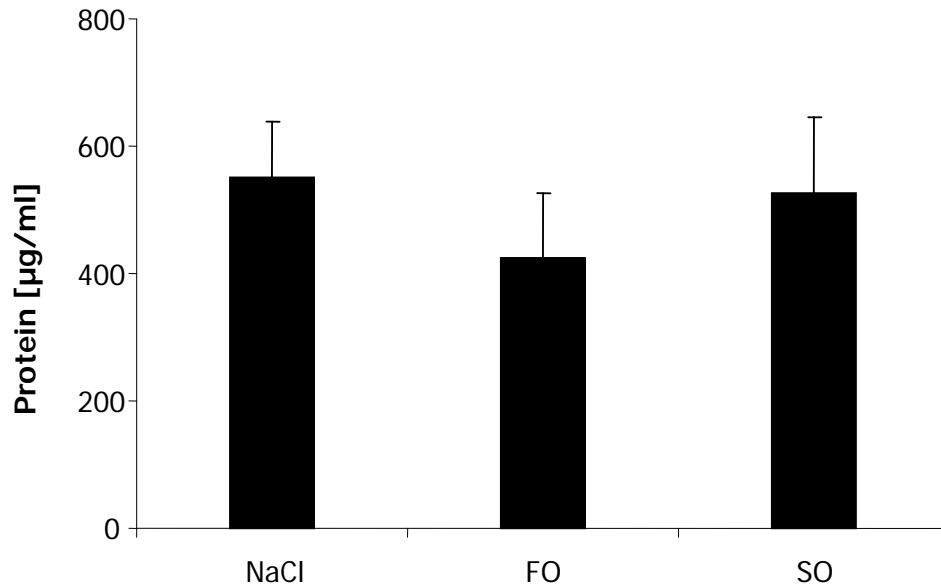


Abbildung 44: Proteinkonzentration in BAL bei 10 μg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden bei PAF-RA-Mäusen

Proteingehalt in der Lavageflüssigkeit bei PAF-RA-Mäusen. Die Mäuse wurden mit 10 μg LPS i.t. stimuliert und die Lavage wurde 24 Stunde später durchgeführt. Zugleich dazu erhielten die Mäuse über drei Tage entweder eine NaCl-, FO-, oder SO-Infusion. Dargestellt sind $\text{MW} \pm \text{SEM}$; $n=4-6$.

Diese Versuchsserie (WT mit PAF-RA BN 52021) wurde eingesetzt, um die Ergebnisse der PAF-R-KO-Mäuse zu bestätigen und zu validieren. Die Analyse der Daten zeigte, dass es zu einer vollständigen Ausbildung einer akuten Lungenentzündung durch das Endotoxin LPS in allen Dosierungen kam. Allerdings, wie schon bei den PAF-R-KO, ist die immun-modulierende Wirkung der Lipidemulsionen sowohl bei der Langzeit- (PAF-R-KO), als auch bei der Kurzzeit-(BN)-Inhibition des PAF-PAF-Rezeptor-Signalweges aufgehoben.

Setzt man nun die ermittelten Werte der verschiedenen Mauslinien in Vergleich, wird deutlich, dass ein „*protein leakage*“ aus den Gefäßen in die Lungenalveolen auch bei Unterbrechung des PAF–PAF-Rezeptor–Systems stattfindet. Betrachtet man nun einmal die 10 µg LPS-Konzentrationswerte im Vergleich, ist zu erkennen, dass sich die ermittelten Proteinkonzentrationen nicht signifikant voneinander unterscheiden (Abb. 45).

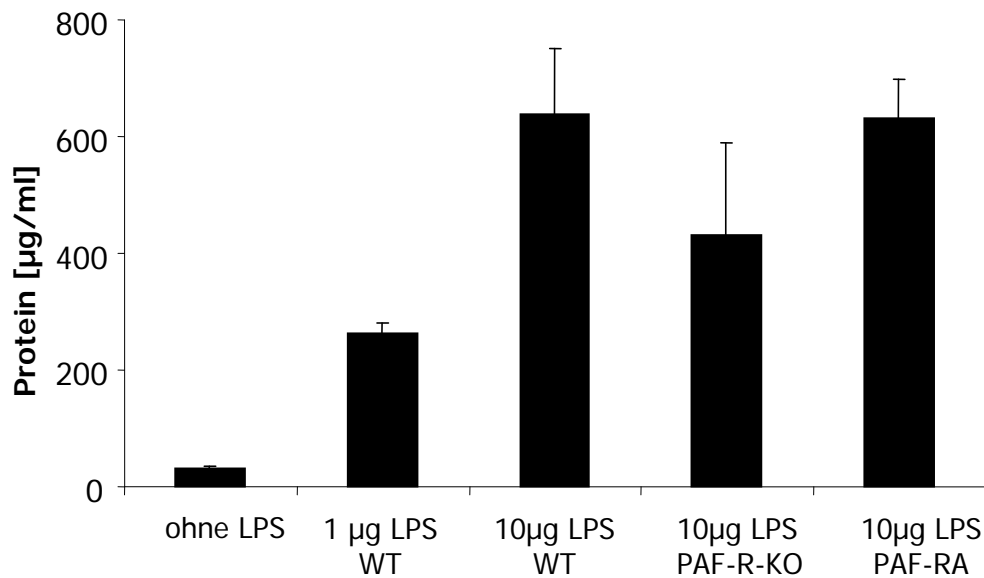


Abbildung 45: Proteinkonzentration in der BAL im Vergleich

Unterschiedliche Mauslinien und LPS-Konzentrationen. Dargestellt sind die MW \pm SEM; n=4-21.

3.5 Synthese pro-inflammatorischer Zytokine

Gemessen wurden die beiden pro-inflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Makrophagen Inflammatorisches Protein - 2 (MIP-2) in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit.

TNF- α wird von verschiedenen Entzündungszellen nach Einwirkung von LPS gebildet. Er nimmt aktiven Einfluss auf die Entzündung durch Bildung weiterer Zytokine, zeigt Einwirkung auf den Lipid- und Proteinstoffwechsel und verursacht Veränderungen physiologischer Parameter, löst z.B. Fieber und Tachykardie aus.

MIP-2 steht für Makrophagen Inflammatorisches Protein - 2 und entspricht dem humanen Interleukin-8. Es wirkt als Chemoattraktans für Leukozyten. Somit löst es eine vermehrte Leukozytenrekrutierung an dem Ort der Entzündung aus.

3.5.1 Ergebnisse der WT-Mäuse

3.5.1.1 Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)

Untersucht wurde der Einfluss der Lipidemulsionen auf die intra-alveoläre Produktion von Zytokinen in unserem Modell. 24 Stunden nach Stimulation mit 1 μ g des Endotoxins LPS und Infusion mit Kochsalzlösung wurde eine Erhöhung der TNF- α -Konzentration von einem Wert unterhalb des Detektionspunktes bei unstimulierten Mäusen (n=4) bis auf 162 ± 12 pg/ml (n=11) nachgewiesen (Abb. 46). Bei den Mäusen, deren Infusionslösung n-3-Fettsäuren beinhaltete, war die gemessene TNF- α -Synthese signifikant vermindert. Hier lagen die Werte bei 90 ± 7 pg/ml (n=5) des Zytokins in der Lavage. Die ermittelten Werte der FO-Gruppe bei 1 μ g LPS waren sowohl signifikant zu den Werten der Kontrollgruppe als auch zur SO Infusionsgruppe (je $p < 0,05$). Die gemessene Konzentration des pro-inflammatorischen Zytokins stieg in der Mausgruppe, die die SO Lipidemulsion erhielt, signifikant auf 170 ± 20 pg/ml (n=7).

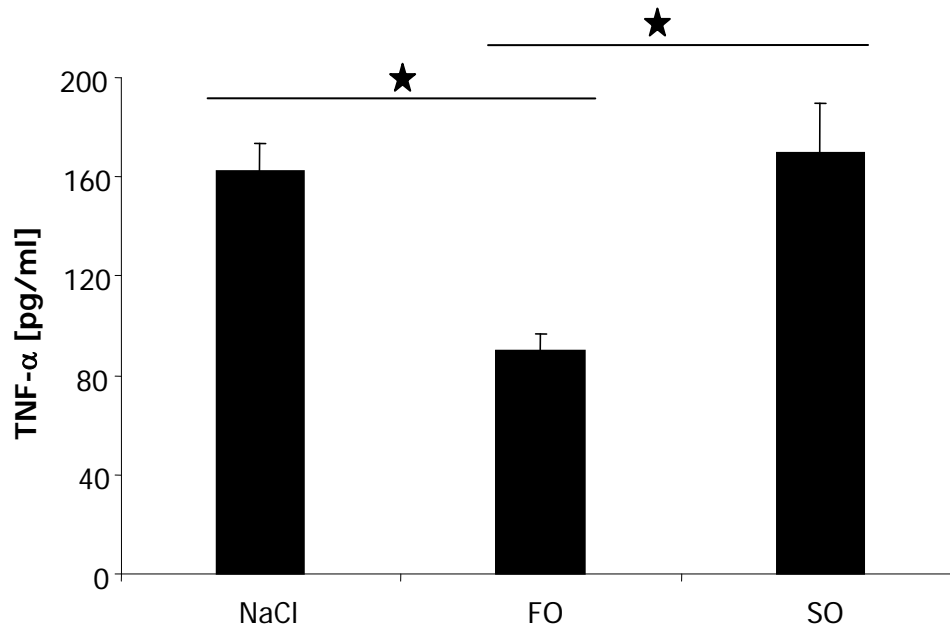


Abbildung 46: TNF- α Konzentration bei WT-Mäusen bei 1 μ g LPS, BAL nach 24 Stunden

WT-Mäuse wurden über drei Tage mit einer unterschiedlichen Infusionslösung (NaCl, FO oder SO) infundiert. Vor Versuchsende wurden sie mit 1 μ g LPS i.t. stimuliert. 24 Stunden später wurde die Lunge lavagiert und die Zytokinkonzentration mittels ELISA ermittelt. *, $p < 0,05$; dargestellt sind MW \pm SEM; $n=5-11$.

Wurden die Mäuse mit 10 μ g LPS i.t. stimuliert, konnten in der Kontrollgruppe Konzentrationen von 564 ± 126 pg/ml ($n=4$) ermittelt werden (Abb. 47). Bei den Mäusen, die n-3-Fettsäuren mit ihrer Infusionslösung erhielten, wurde eine TNF- α -Konzentration von 489 ± 98 pg/ml ($n=4$) in der entsprechenden Lavage gemessen. Die Mäuse, denen SO infundiert worden war, zeigten eine TNF- α -Konzentration in der Lavageflüssigkeit von 582 ± 58 pg/ml ($n=4$). Die Werte der TNF- α -Konzentrationen in der Lavageflüssigkeit bei den Mäusen, die mit 10 μ g LPS i.t. stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert wurden, waren sämtlich nicht signifikant voneinander verschieden.

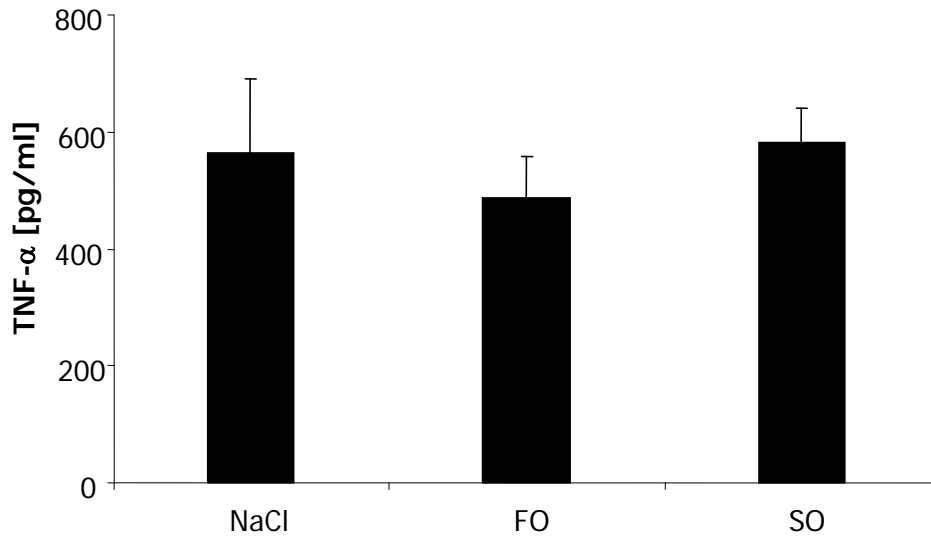


Abbildung 47: TNF- α -Konzentration bei WT-Mäusen bei 10 μ g LPS, BAL nach 24 Stunden

WT-Mäuse wurden über drei Tage entweder mit NaCl, FO oder SO infundiert. Vor Versuchsende wurden sie mit 10 μ g LPS i.t. stimuliert. 24 Stunden später wurde die Lunge lavagiert und die Zytokinkonzentration mittels ELISA ermittelt. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=4.

Um die Konzentration des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α in der BAL zu bestimmen und daraus Rückschlüsse über die Synthese im Verlauf einer Entzündung zu ziehen, wurden WT-Mäuse, die vorher mit NaCl infundiert worden waren, mit 10 μ g LPS i.t. stimuliert (Abb. 48). Diesmal wurden sie 4 Stunden später lavagiert. In der Kontrollgruppe wurde hierbei ein Wert von 1496 ± 92 pg/ml (n=11) in der BAL-Flüssigkeit gemessen. Es zeigt sich, dass das Zytokin zu Beginn einer Entzündung gebildet und sezerniert wird und 24 Stunden später schon wieder in einer niedrigen Konzentration vorliegt.

Ergebnisse

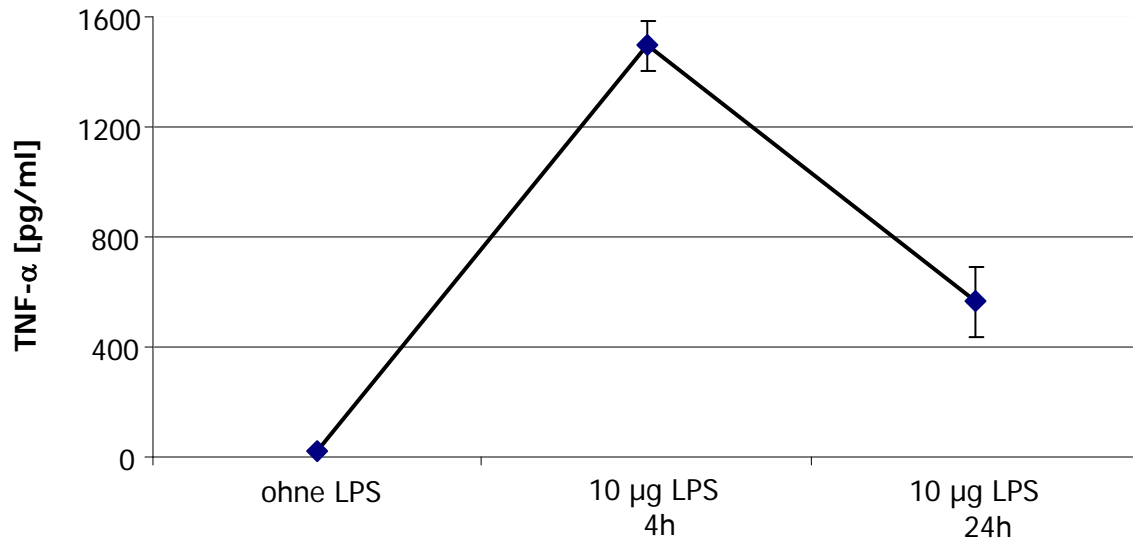


Abbildung 48: Konzentration des Zytokins TNF- α im Zeitverlauf bei WT-Mäusen bei 10 μ g LPS i.t.

Stimuliert wurden NaCl-infundierte Mäuse mit 10 μ g LPS i.t., bzw. 0,9% NaCl als Trägerstoff, und sie wurden nach 4 bzw. 24 Stunden lavagiert und die TNF- α -Konzentration in der BAL gemessen. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=4-11.

3.5.1.2 Makrophagen Inflammatorisches Protein - 2 (MIP-2)

Die Konzentration des Zytokins MIP-2 stieg von nicht messbaren Werten (Zeitpunkt 0 und ohne LPS-Stimulierung) auf 112 ± 6 pg/ml (n=8) in der mit NaCl-Lösung infundierten Kontrollgruppe, die mit 1 μ g LPS stimuliert wurde (Abb. 49). Der Zytokinspiegel in der Gruppe der FO-infundierten Mäuse war signifikant reduziert. So lagen die ermittelten Werte der MIP-2-Konzentrationen in der Lavage bei 1 μ g LPS i.t. bei 68 ± 8 pg/ml (n=4). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Höhe des MIP-2-Spiegels bei den mit SO infundierten Mäusen ähnlich. Die ermittelten Werte lagen bei 99 ± 2 pg/ml (n=4), sofern die Mäuse mit 1 μ g LPS i.t. behandelt wurden. Zwischen der Kontrollgruppe infundiert mit NaCl und der FO-Gruppe besteht eine signifikante Differenz mit $p < 0,001$. Auch kam es zwischen der FO- und SO-Infusionsgruppe zu signifikanten Unterschieden mit $p < 0,05$.

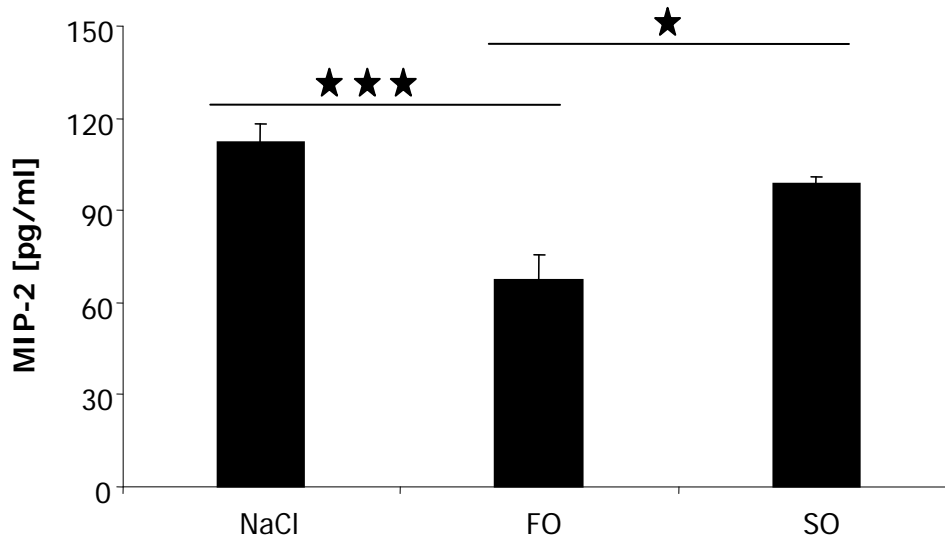


Abbildung 49: MIP-2-Konzentration bei WT-Mäusen bei 1 µg LPS, BAL nach 24 Stunden

Konzentration des Zytokins MIP-2 in der broncho-alveolären Lavage, bei verschieden infundierten (NaCl, FO und SO) Mäusen. Die Mäuse wurden mit 1 µg LPS intratracheal stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert. Zeitgleich erhielten sie entweder eine 0,9%ige NaCl-, FO- oder SO-Infusion. ***, $p < 0,001$ zwischen NaCl und FO. *, $p < 0,05$ zwischen FO und SO; dargestellt sind MW \pm SEM; $n=4-8$.

Nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. lag in der NaCl-Gruppe nach 24 Stunden ein Wert von 165 ± 18 pg/ml ($n=5$) vor (Abb. 50). Bei Tieren, die FO erhielten und mit 10 µg LPS i.t. stimuliert wurden, lagen die Werte der Zytokinkonzentration nach 24 Stunden bei 140 ± 18 pg/ml ($n=7$). Nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. und Lavage nach 24 Stunden fanden sich noch deutliche Konzentrationen von 741 ± 73 pg/ml ($n=4$) in der Lavageflüssigkeit bei den Mäusen, die mit SO infundiert wurden. Die Signifikanz beträgt jeweils $p < 0,001$.

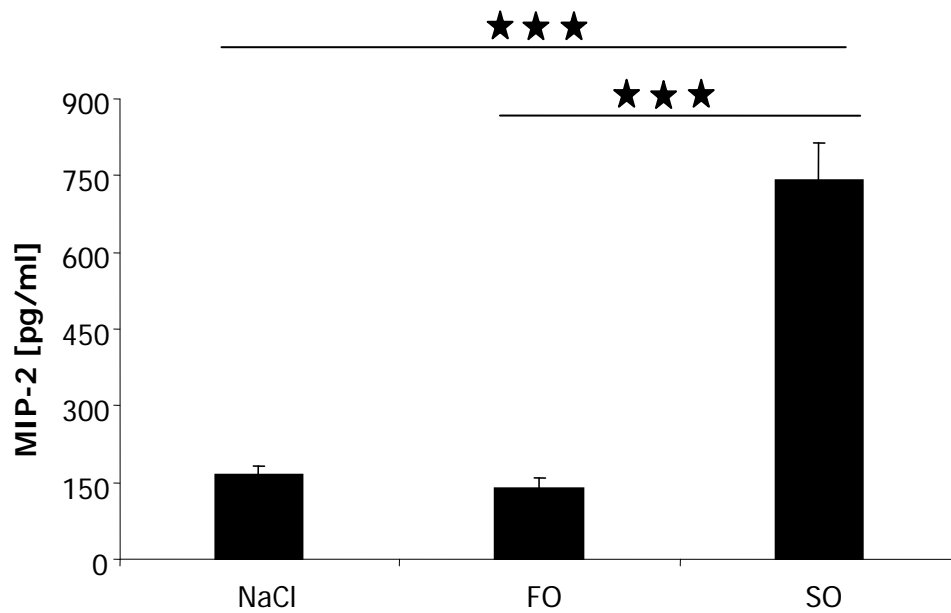


Abbildung 50: MIP-2 Konzentration bei WT-Mäusen bei 10 µg LPS, BAL nach 24 Stunden

Konzentration des Zytokins MIP-2 in der broncho-alveolären Lavage bei Mäusen, die drei Tage lang entweder eine NaCl-, FO- oder SO-Infusion erhielten. Die Mäuse wurden mit 10 µg LPS intratracheal stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert. ***, $p < 0,001$; dargestellt sind MW \pm SEM; $n=4-7$.

Wiederum sollte gezeigt werden, wie dieses Zytokin im Verlauf einer Entzündung gebildet wird. WT-Mäuse wurden mit NaCl infundiert und mit 10 µg LPS i.t. stimuliert. 4 Stunden später wurden die Mäuse lavagiert und die Konzentration des Zytokins MIP-2 bestimmt. Hierbei wurden Werte von 1225 ± 96 pg/ml ($n=5$) nach 4 Stunden ermittelt (Abb. 51).

Es zeigte sich, dass es zu Beginn einer Entzündung – hier nach 4 Stunden – zu einem starken Anstieg des Zytokins in der Lavageflüssigkeit kommt. Nach 24 Stunden nimmt die Konzentration des Botenstoffes, gemessen in der BAL, wieder ab.

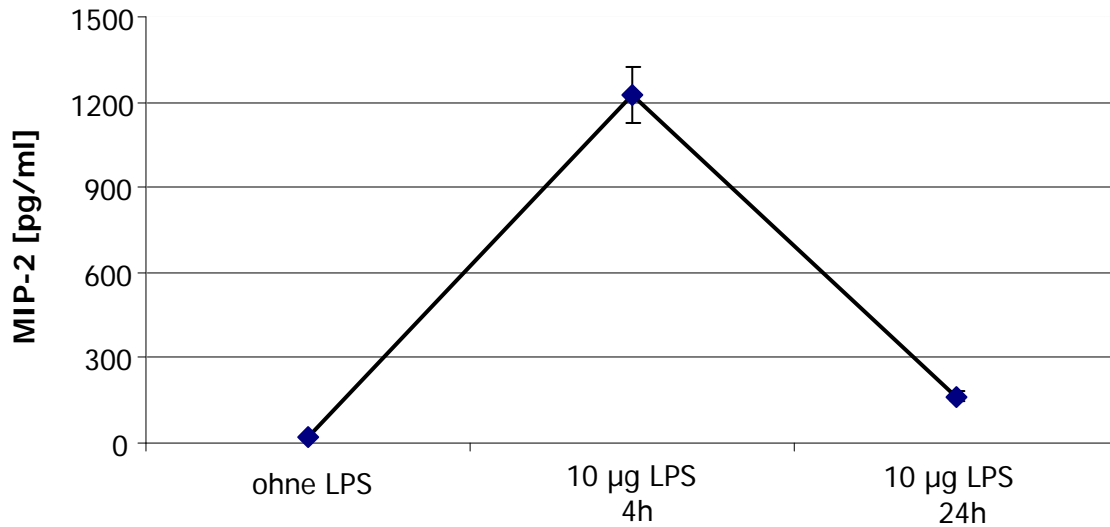


Abbildung 51: Konzentration des Zytokins MIP-2 im Zeitverlauf bei WT-Mäusen bei 10 µg LPS i.t.

Stimuliert wurden NaCl-infundierte Mäuse mit 10 µg LPS i.t., bzw. 0,9% NaCl als Trägerstoff, und sie wurden nach 4 bzw. 24 Stunden lavagiert und die MIP-2-Konzentration in der BAL gemessen. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=4-8.

3.5.2 Ergebnisse der PAF-Rezeptor-Knock out-Mäuse

Die PAF-R-KO-Mäuse wurden ebenfalls entweder mit NaCl, FO oder SO infundiert. Im Anschluss daran wurden sie mit 1 µg respektive 10 µg LPS intratracheal stimuliert und 24 Stunden später broncho-alveolär lavagiert.

3.5.2.1 TNF- α

Bei den PAF-Rezeptor-KO-Mäusen, die mit NaCl-Lösung infundiert wurden, waren die TNF- α -Spiegel nach LPS-Stimulation im Vergleich zu den WT-Mäusen geringfügig erniedrigt. Die Werte lagen nach Stimulation mit 1 µg LPS i.t. und Lavage nach 24 Stunden bei 149 ± 23 pg/ml (n=6; Abb. 52). Die TNF- α -Konzentrationen in den Gruppen, die mit Lipidemulsionen infundiert und anschließend mit LPS stimuliert wurden, waren zwar geringer als in der vergleichbaren Kontrollgruppe, aber im Vergleich zu den WT-Mäusen waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar. So

wiesen Mäuse, denen FO infundiert wurden, Konzentrationen des Zytokins TNF- α in der BAL-Flüssigkeit nach Stimulation mit 1 μ g bei 126 ± 16 (n=8) auf. In der Gruppe, die mit SO infundiert und mit 1 μ g LPS i.t. stimuliert wurde, stieg die Zytokinproduktion auf eine Konzentration von 142 ± 38 pg/ml (n=8).

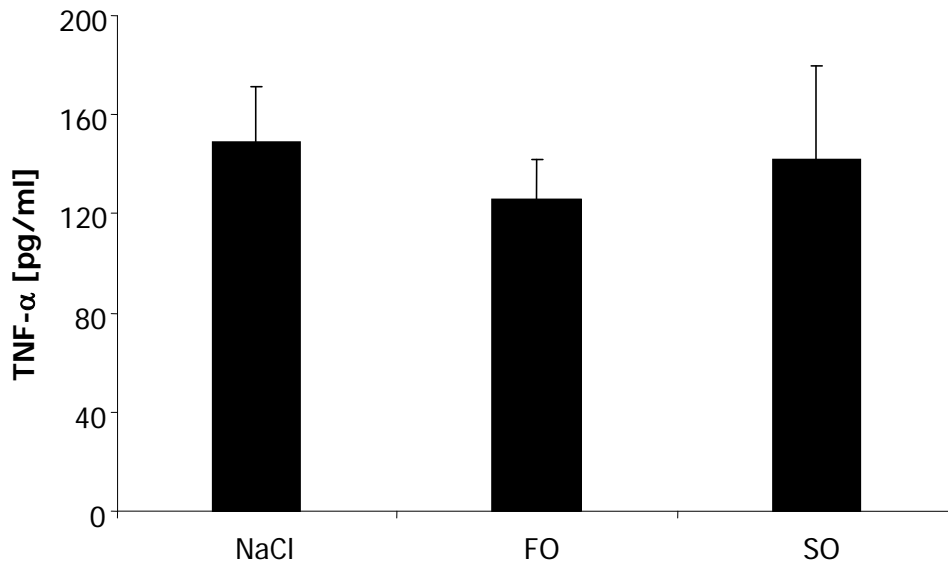


Abbildung 52: TNF- α -Konzentration bei PAF-R-KO-Mäusen bei 1 μ g LPS, BAL nach 24 Stunden

Konzentration des Zytokins TNF- α in der broncho-alveolären Lavage bei PAF-R-KO-Mäusen, die drei Tage lang entweder eine NaCl-, FO- oder SO-Infusion erhielten. Die Mäuse wurden mit 1 μ g LPS intratracheal stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=6-8.

Wiederum wurden die verschiedenen Mausgruppen mit der 10-fachen Dosis an LPS stimuliert. Die Zytokinkonzentrationen stiegen erwartungsgemäß an (Abb. 53). Die BAL fand wieder 24 Stunden später statt. Bei den Tieren, denen NaCl infundiert worden war, wurde bei dieser LPS-Konzentration ein Wert von 348 ± 99 pg/ml (n=4) gemessen. In der FO-Gruppe wurde 417 ± 124 pg/ml (n=4) im ELISA ermittelt. Die Mäuse, die SO erhielten, zeigten ähnlich erhöhte Werte. Hier wurde eine Konzentration von 280 ± 55 pg/ml (n=4) nach 24 h gemessen.

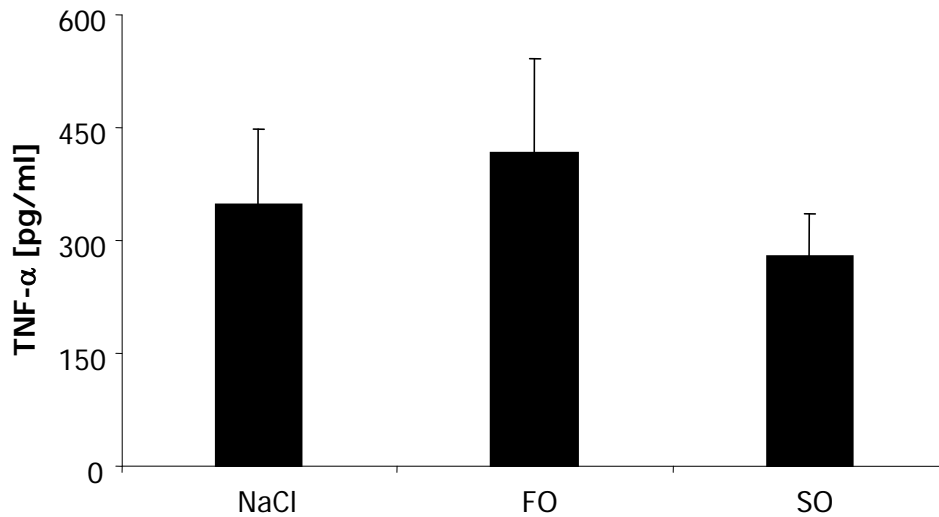


Abbildung 53: TNF- α -Konzentration bei PAF-R-KO-Mäusen bei 10 μ g LPS, BAL nach 24 Stunden

Konzentration des Zytokins TNF- α in der broncho-alveolären Lavage bei PAF-R-KO-Mäusen, die drei Tage lang entweder eine NaCl-, FO- oder SO-Infusion erhielten. Die Mäuse wurden mit 10 μ g LPS intratracheal stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=4.

In allen Versuchsgruppen kann man erkennen, dass LPS eine gleich starke Auswirkung auf die Zytokinproduktion zeigt wie bei den WT-Mäusen. Im Vergleich zu den WT-Mäusen ist bei den Ergebnissen der PAF-R-KO-Mäuse die divergierende Wirkung der unterschiedlichen Fettsäuren wieder aufgehoben.

3.5.2.2 MIP-2

Die Höhe der MIP-2-Konzentrationen nach LPS-Stimulierung waren bei den PAF-Rezeptor-KO- vergleichbar mit den WT-Mäusen. So wurden in der NaCl-Infusionsgruppe bei einer Stimulation der Lunge mit 1 μ g LPS Werte von 115 ± 8 pg/ml (n=5) ermittelt (Abb. 54). Waren die Mäuse mit FO infundiert, wurde eine Konzentration des Zytokins MIP-2 von 94 ± 7 pg/ml (n=9) detektiert. Bei einer Infusion mit FO konnten Werte der Zytokinkonzentration von 105 ± 7 pg/ml (n=7) in der BAL-Flüssigkeit ermittelt werden.

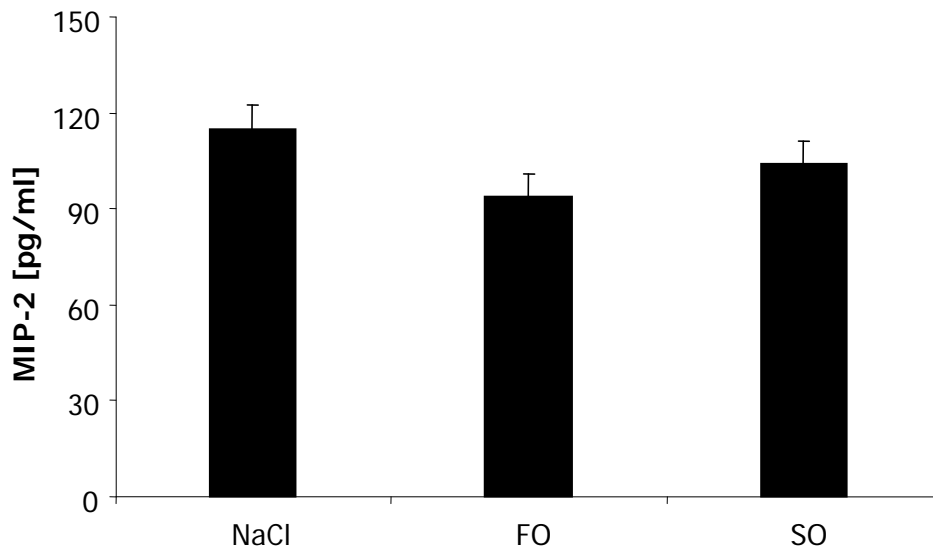


Abbildung 54: MIP-2 Konzentration bei PAF-R-KO-Mäusen bei 1 µg LPS, BAL nach 24 Stunden

Konzentration des Zytokins MIP-2 in der broncho-alveolären Lavage bei PAF-R-KO-Mäusen, die drei Tage lang entweder eine NaCl-, FO- oder SO-Infusion erhielten. Die Mäuse wurden mit 1 µg LPS intratracheal stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert. Gezeigt sind MW ± SEM; n=5-9.

Die Zytokinkonzentration stieg bei einer Erhöhung der LPS-Konzentration auf 10 µg und Lavage nach 24 Stunden auf 190 ± 40 pg/ml (n=4) bei den Mäusen, denen NaCl-Lösung infundiert wurde, und war im Vergleich zur Stimulation mit 1 µg LPS i.t. erhöht (Abb. 55). Die MIP-2-Konzentrationen in den beiden mit unterschiedlichen Lipidemulsionen infundierten Gruppen waren ähnlich der Kontrollgruppe (NaCl-Infusion). Die Divergenz der Fettsäuren war in den beiden Lipidemulsionsgruppen aufgehoben. In der FO-infundierten Gruppe wurde eine Zytokinkonzentration von 175 ± 49 pg/ml (n=4) gemessen. Bei den Mäusen, denen SO infundiert worden war, wurde ein Wert des Zytokins MIP-2 von 219 ± 69 pg/ml (n=4) ermittelt.

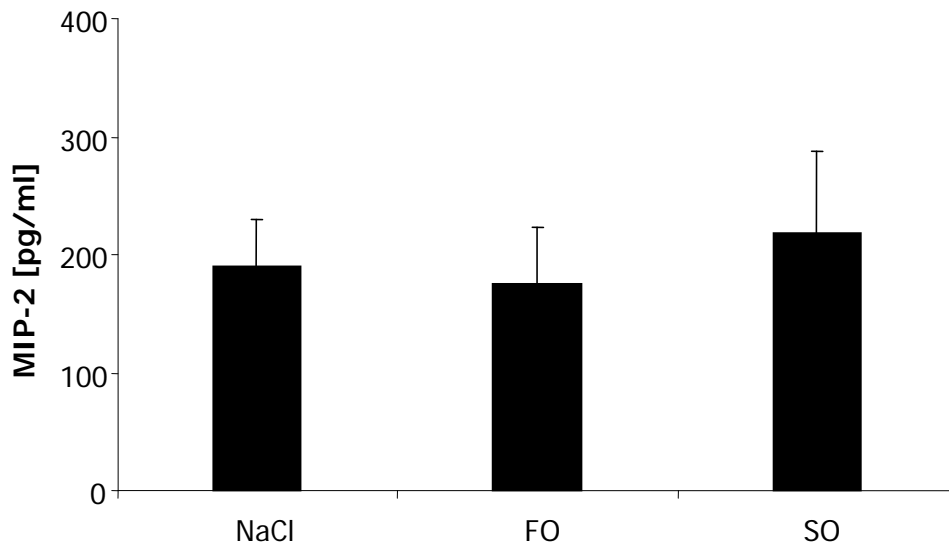


Abbildung 55: MIP-2 Konzentration bei PAF-R-KO-Mäusen bei 10 µg LPS, BAL nach 24 Stunden

Konzentration des Zytokins MIP-2 in der broncho-alveolären Lavage bei PAF-R-KO-Mäusen, die drei Tage lang entweder eine NaCl-, FO- oder SO-Infusion erhielten. Die Mäuse wurden mit 10 µg LPS intratracheal stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert. Gezeigt sind MW \pm SEM; n=4.

Die Immunantwort auf den LPS-Stimulus ist auch bei diesen vorbehandelten Mäusen vorhanden, aber die immun-modulierende Wirkung der Lipide wird auch bei der Zytokinproduktion bei fehlendem PAF-Rezeptor nicht evident.

3.5.3 Ergebnisse der WT plus PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021

Um die Ergebnisse der PAF-Rezeptor-KO-Mäuse zu überprüfen, wurden WT-Mäuse verwendet, denen der PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021 injiziert worden war. Bei den infundierten und 30 min vor intratrachealer LPS-Stimulation mit dem PAF-Rezeptor-Antagonisten BN 52021 behandelten Mäusen wurde ein Anstieg der Zytokinkonzentration in der BAL-Flüssigkeit gemessen.

3.5.3.1 TNF- α

Die TNF- α -Konzentration bei mit Natriumchlorid infundierten Mäusen lag bei einer Stimulation mit 1 μ g LPS und Lavage nach 24 Stunden bei 100 ± 11 pg/ml (n=9). Ähnlich wie bei den PAF-Rezeptor-KO-Mäusen war der Unterschied zwischen den beiden unterschiedlichen Lipidemulsionen bei der Generation des Zytokins TNF- α von den Alveolarzellen aufgehoben (Abb. 56). So ergaben sich für die FO-infundierte Gruppe Werte von 65 ± 3 pg/ml (n=4). In der Gruppe der Mäuse mit SO-Infusion wurde eine Konzentration von 115 ± 5 pg/ml (n=4) in der BAL-Flüssigkeit gemessen.

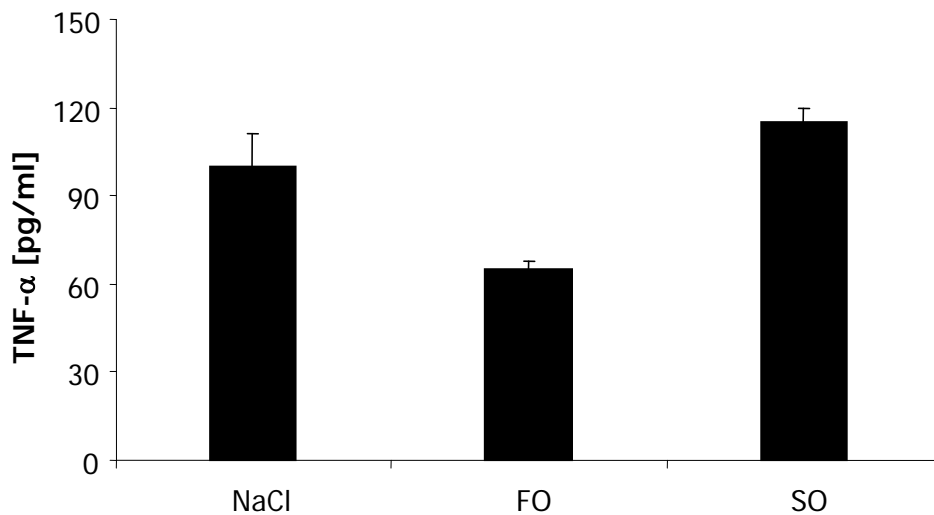


Abbildung 56: TNF- α -Konzentration bei PAF-RA-Mäusen bei 1 μ g LPS, BAL nach 24 Stunden

Konzentration des Zytokins TNF- α in der broncho-alveolären Lavage bei PAF-RA-Mäusen, die drei Tage lang entweder mit NaCl, FO oder SO infundiert und vor LPS-Eingabe mit dem PAF-R-Antagonisten BN 52021 behandelt wurden. Die Mäuse wurden mit 1 μ g LPS intratracheal stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=4-9.

Zum Vergleich der unterschiedlichen Schwere einer Lungenentzündung wurden Mäuse mit 10 µg LPS i.t. stimuliert (Abb. 57). Bei 10 µg LPS i.t. und Lavage nach 24 Stunden stieg die Zytokinkonzentration in der Kontrollgruppe (NaCl-Infusion) auf 525 ± 126 pg/ml (n=4). Die Wirkung der unterschiedlichen Lipide war auch hier wieder aufgehoben. In der Gruppe, in der die Mäuse mit der n-3-reichen Lipidemulsion infundiert wurden, wurde eine Konzentration von 488 ± 32 pg/ml (n=5) gemessen und bei den SO-infundierten Mäusen lag die Konzentration des Zytokins TNF- α bei 468 ± 153 pg/ml (n=4).

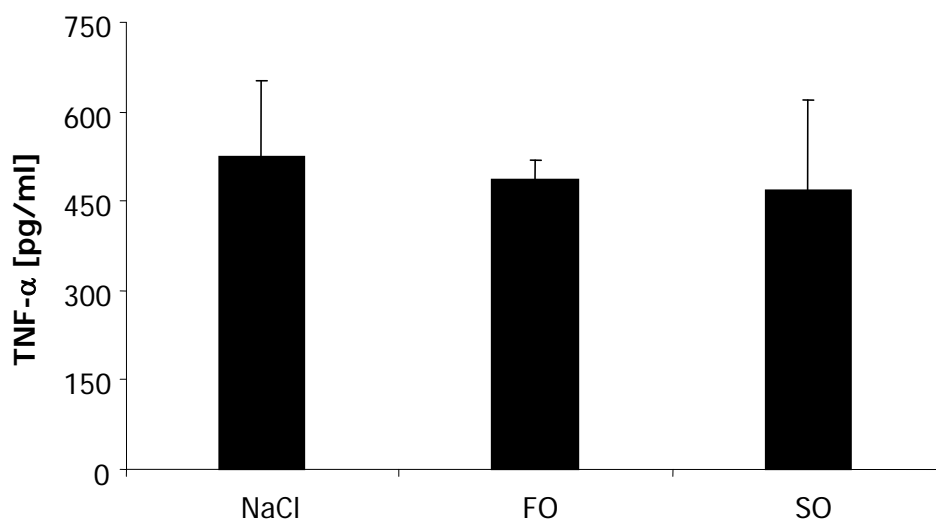


Abbildung 57: TNF- α -Konzentration bei PAF-RA-Mäusen bei 10 µg LPS, BAL nach 24 Stunden

Konzentration des Zytokins TNF- α in der broncho-alveolären Lavage bei PAF-RA-Mäusen, die drei Tage lang entweder mit NaCl, FO oder SO infundiert und vor LPS-Eingabe mit dem PAF-R-Antagonisten BN 52021 behandelt wurden. Die Mäuse wurden mit 10 µg LPS intratracheal stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert. Dargestellt sind MW \pm SEM; n=4-5.

Betrachtet man noch die unterschiedlichen Versuchsgruppen im Vergleich, kann man beurteilen, in welchem unterschiedlichem Maß sie auf einen Stimulus mit LPS reagieren (Abb. 58). Dieser Vergleich zeigt, dass in allen Gruppen eine Entzündung hervorgerufen werden konnte. Das pro-inflammatorische Zytokin $\text{TNF-}\alpha$ wurde gebildet. Obwohl einem Teil der Mäuse der PAF–PAF-Rezeptor-Signalweg fehlte, reagierten sie auf das LPS und entwickelten eine Entzündung, die der der WT-Mäuse entsprach.

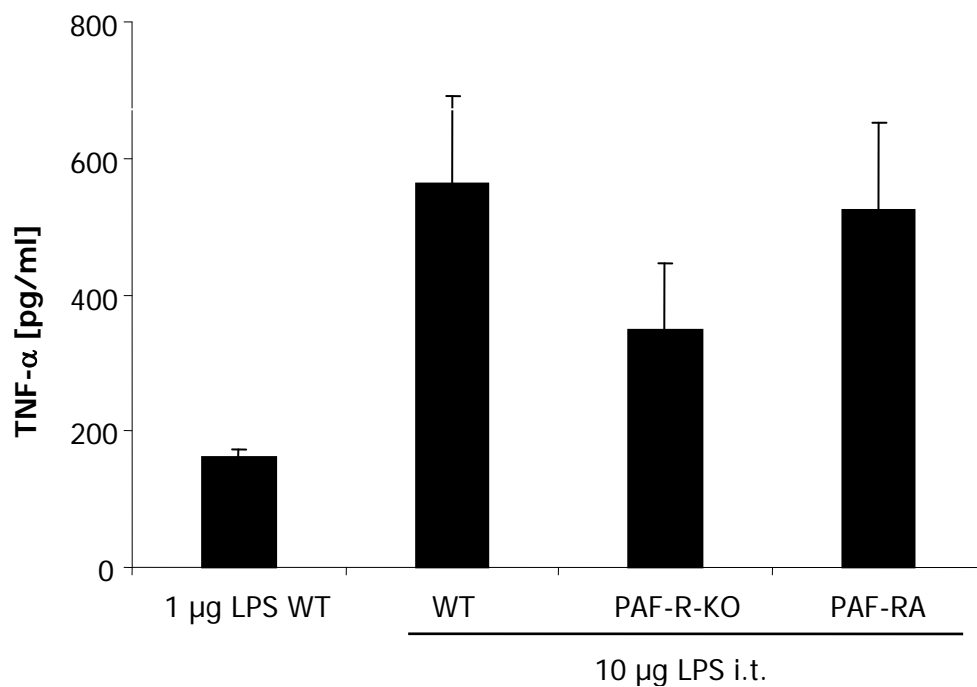


Abbildung 58: Konzentrationswerte des Zytokins $\text{TNF-}\alpha$ bei den verschiedenen Mauslinien im Vergleich

Die Mäuse wurden über drei Tage mit NaCl infundiert und dann mit LPS stimuliert. Ein Teil der WT-Mäuse wurde mit 1 µg LPS stimuliert, der Rest der Mäuse erhielt 10 µg LPS i.t.. Die Mäuse wurden 24 Stunden später lavagiert. Gezeigt wird $\text{MW} \pm \text{SEM}$; $n=4-11$.

3.5.3.2 MIP-2

Das pro-inflammatorische Zytokin MIP-2 wurde ebenfalls aus der BAL-Flüssigkeit mittels ELISA gemessen.

Die intra-alveolare Zytokinanalyse von MIP-2 24 Stunden nach intratrachealer Instillation von 1 µg LPS und Vorbehandlung mit dem PAF-Rezeptor-Antagonisten BN 52021 zeigt bei den mit NaCl infundierten Mäusen eine Reduktion auf 1/3 des Wertes der entsprechenden WT-Mäuse auf 43 ± 4 pg/ml (n=12). Die Werte der Zytokinkonzentration bei FO-infundierten Mäusen, die 24 Stunden vor Lavage mit 1 µg LPS i.t. stimuliert wurden, lagen bei 31 ± 3 pg/ml (n=4). In der Mausgruppe, die mit SO infundiert worden war, lag die Konzentration des Zytokins MIP-2 in der Lavage bei 32 ± 3 pg/ml (n=5; Abb. 59).

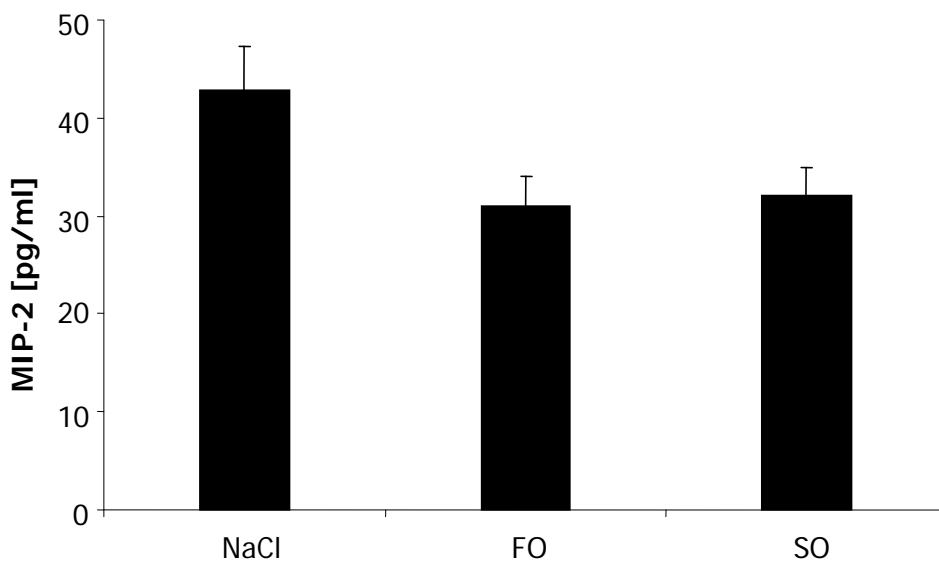


Abbildung 59: MIP-2 Konzentration bei PAF-RA-Mäusen bei 1 µg LPS, BAL nach 24 Stunden

Konzentration des Zytokins MIP-2 in der broncho-alveolären Lavage bei PAF-RA-Mäusen, die drei Tage lang entweder mit NaCl, FO oder SO infundiert und vor LPS-Eingabe mit dem PAF-R-Antagonisten BN 52021 behandelt wurden. Die Mäuse wurden mit 1 µg LPS intratracheal stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert. Gezeigt sind MW \pm SEM; n=4-12.

Nach Stimulation mit 10 µg LPS i.t. lag die Zytokinkonzentration in der BAL in der NaCl-infundierten Mausgruppe nach 24 Stunden bei 121 ± 13 pg/ml (n=4). Dieser Wert ist entsprechend höher im Vergleich zu der geringeren Stimulation mit 1 µg LPS.

Bei den FO-infundierten Mäusen wurde eine Konzentration von 123 ± 20 pg/ml (n=4) nach 24 Stunden und Stimulation mit 10 µg LPS i.t. gemessen und bei den SO-infundierten Mäusen lag die MIP-2-Konzentration in der Lavage bei 114 ± 19 pg/ml (n=4; Abb. 60).

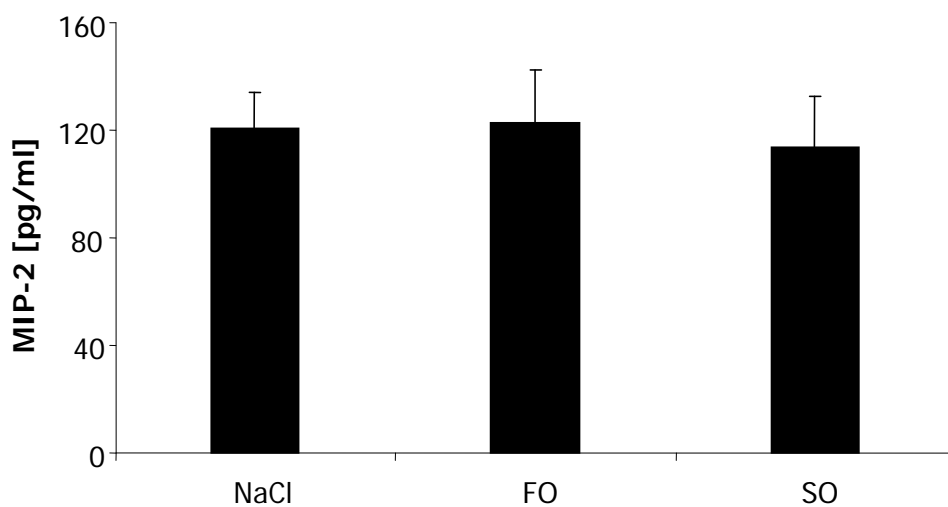


Abbildung 60: MIP-2 Konzentration bei PAF-RA-Mäusen bei 10 µg LPS, BAL nach 24 Stunden

Konzentration des Zytokins MIP-2 in der broncho-alveolären Lavage bei PAF-RA-Mäusen, die drei Tage lang entweder mit NaCl, FO oder SO infundiert und vor LPS-Eingabe mit dem PAF-R-Antagonisten BN 52021 behandelt wurden. Die Mäuse wurden mit 10 µg LPS intratracheal stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert. Gezeigt sind MW \pm SEM; n=4.

Vergleicht man nun wieder die ermittelten Daten der unterschiedlichen Gruppen, erkennt man deutlich, dass in allen Versuchsgruppen eine Entzündung durch das Endotoxin LPS hervorgerufen wurde (Abb. 61). Obwohl einem Teil der Mäuse der PAF–PAF-Rezeptor-Signalweg fehlte, reagierten sie auf das LPS und entwickelten eine Entzündung, die dem Grad der Entzündung der WT-Mäuse gleich kam. Aber nur bei den WT-Mäusen zeigte sich die immun-modulatorische Wirkung der Lipide. Diese Wirkung war bei den zwei Mauslinien mit Ausschaltung des PAF–PAF-Rezeptor-Signalweges komplett aufgehoben.

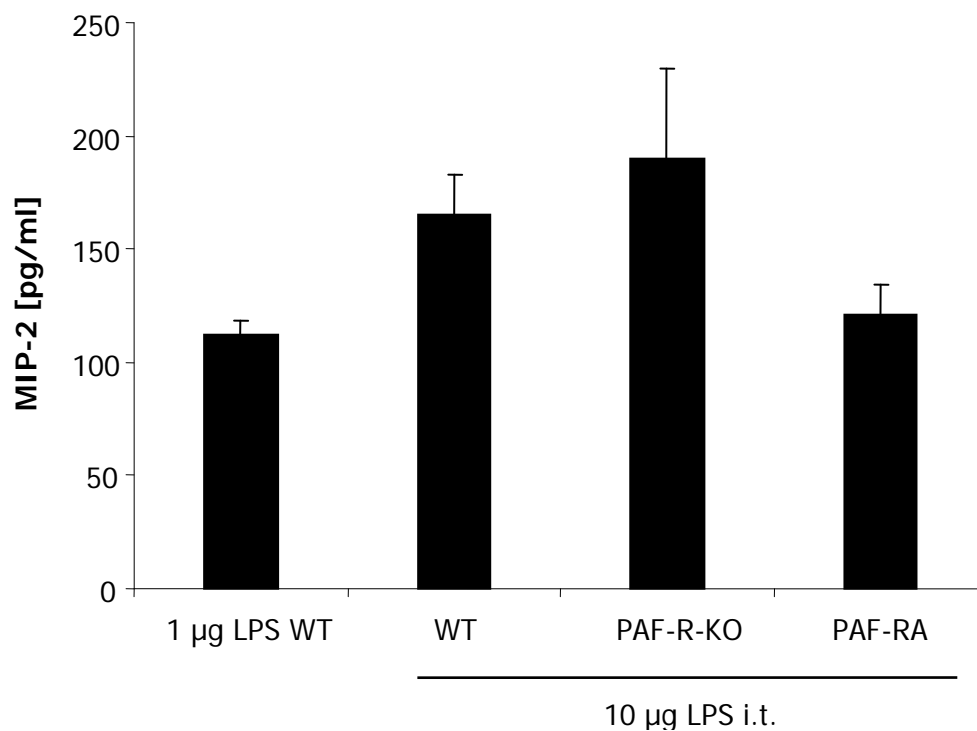


Abbildung 61: Konzentrationswerte des Zytokins MIP-2 bei den verschiedenen Mauslinien im Vergleich

Die Mäuse wurden über drei Tage mit NaCl infundiert und dann mit LPS stimuliert. Ein Teil der WT-Mäuse wurde mit 1 µg LPS stimuliert, der Rest der Mäuse erhielt 10 µg LPS i.t.. Die Mäuse wurden 24 Stunden später lavagiert. Gezeigt wird MW ± SEM; n=4-8.

4 Diskussion

4.1 Auslösung eines akuten Lungenversagens im Mausmodell

4.1.1 Das LPS-induzierte akute Lungenversagen (ALI) in der Maus

Das LPS-induzierte Modell des akuten Lungenversagens in der Maus ist gut charakterisiert. *Delayre-Orthez et al.* zeigten, dass eine Dosis von 1 µg Lipopolysaccharid (LPS), intratracheal instilliert, eine mittelgradige Lungenschädigung hervorruft. *Szarka et al.* setzten eine höhere LPS-Dosis von 10 µg LPS i.t. ein und bewirkten damit eine Lungenschädigung schwereren Ausmaßes [Delayre-Orthez et al. 2005; Szarka et al. 1997].

Neben LPS sind weitere Stimuli zur Generierung einer akuten Lungenschädigung etabliert: zum Beispiel Lipoteichonsäure (LTA), ein Wandbestandteil gram-positiver Bakterien, oder Salzsäure [Nagase et al. 1999; Yipp et al. 2002].

Yipp et al. zeigten Unterschiede zwischen LPS und LTA in einem Mausmodell. In ihren Experimenten wiesen sie nach, dass LTA im Vergleich zu LPS keinerlei systemische und nur geringe lokale Auswirkungen auf leukozytäre-endotheliale Interaktionen zeigte. Im Gegensatz hierzu resultierte eine lokale Gabe von LPS, das sie unter die Haut des Skrotums applizierten, in Rollen, Adhäsion und schließlich Transmigration der Leukozyten ins umliegende Gewebe. Diese Vorgänge wurden von dieser Arbeitsgruppe mittels Intravitalmikroskopie gemessen und beurteilt [Yipp et al. 2002].

Szarka et al. bewiesen in ihren Experimenten, dass bei einer intranasalen Gabe von 10 µg LPS/Maus ein akutes Lungenversagen innerhalb von 2 - 4 Stunden ausgelöst wurde. Eine maximale Schädigung war nach 24 - 48 Stunden erreicht. Bei höheren Dosen zeigte sich eine Sepsis-ähnliche Antwort, bei der auch die Granulozyten in andere Organsysteme rekrutiert wurden. Des Weiteren zeigte die Arbeitsgruppe,

dass gereinigtes LPS aus *E. coli* eine stärkere Immunantwort hervorrief als ein hitzeabgetötetes *E. coli*-Bakterium [Szarka et al. 1997].

Die Arbeitsgruppe *Ishii et al.* publizierte Ergebnisse von Mäusen, denen Salzsäure (HCl) intratracheal instilliert wurde. In diesen Mäusen wurden vermehrt Protein und Leukozyten in der broncholaveolären Lavageflüssigkeit gefunden. Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Mäuse ein starkes Lungenödem und Lungenschädigung entwickelten. Einschränkend ist jedoch bei diesem Stimulus anzumerken, dass die Überlebensspanne der Mäuse nur zwei bis drei Stunden betrug [Nagase et al. 1999].

In der vorliegenden Arbeit sollte das akute Lungenversagen anhand der Invasion der Leukozyten in den Alveolarraum (Abb. 20 + 21), der Proteinextravasation (Abb. 38 + 39) und Produktion von Zytokinen (Abb. 46, 47, 49, + 50) untersucht und beurteilt werden. Wie vorstehend beschrieben, ist LPS ein akzeptierter Stimulus für die Auslösung eines akuten Lungenversagens mit reproduzierbarer Wirkung. Die Dosis des Stimulus wurde auf 1 µg und 10 µg LPS/Maus festgelegt, um die Auswirkung einer leichteren Form der akuten Lungenschädigung gegenüber der einer stärkeren Form zu untersuchen. Um den Zeitverlauf zu beurteilen, aber auch aus Sicherheitsgründen - die Überlebensrate der Mäuse bei einer intratrachealen Gabe von 10 µg LPS und einer Wartezeit von 24 Stunden wie in unserem Modell war nicht bekannt - wurden auch Werte nach 4 Stunden ermittelt.

Einschränkend ist sicherlich zu bemerken, dass dieses Modell mit Nutzung von LPS ein „*single-hit*“-Modell ist, das die klinische Realität nur eingeschränkt widerspiegelt [Hermann et al. 2002; Yipp et al. 2002]. Die Tiere werden einmalig mit einem aufgereinigten Endotoxin einer einzigen Bakterienart behandelt. Dies steht jedoch im Gegensatz zur Sepsis oder dem ARDS. Beide können durch die kontinuierliche Invasion einer Vielzahl von lebenden Bakterien und Bakterienstämmen (polymikrobielle Erkrankung) ausgelöst werden, die in ihrer Gesamtheit im Körper eine massive Entzündung verursachen.

4.1.2 Ergebnisse des LPS-induzierten ALI unter NaCl-Infusion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle

In den von mir durchgeführten und beschriebenen Experimenten konnte demonstriert werden, dass mit einer intratrachealen Gabe von LPS eine akute Lungenschädigung ausgelöst wird.

Nach Instillation des Endotoxins stieg die Konzentration der Zytokine TNF- α und MIP-2 in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit an. Durch die Entzündungsmediatoren und die chemoattraktive Wirkungsweise des MIP-2 kommt es zu einer nachfolgenden Sequestration der Leukozyten in dem Kapillarbett der Lunge und von dort aus zu einer Transmigration in das Lungeninterstitium und nachfolgend in die Alveolen. Zugleich wirkt TNF- α auf die Schrankenfunktion der Endothelzellen der Gefäße sowie der Alveolarepithelien [Coyne et al. 2002]. Die Störung der Funktion dieser „*tight junctions*“ führt zu einem vermehrten Strom von Entzündungsfaktoren in das jeweilige angrenzende Kompartiment. So kommt es z.B. zu einer gesteigerten Extravasation von Protein aus dem Intravasalraum in die Lungenalveolen.

Dies zeigt sich deutlich im Zeitverlauf. Man kann erkennen, dass nach 4 Stunden die Zytokine TNF- α und MIP-2 deutlich in der BAL ansteigen und ihren Maximalwert erreichen, um nach 24 Stunden fast wieder die Ausgangskonzentration zu erreichen. Sowohl die Leukozytenanzahl in der BAL als auch die Proteinkonzentration zeigen nach 4 Stunden einen leichten Anstieg, erreichen aber ihr Maximum erst nach 24 Stunden. Auch die Werte der Myeloperoxidase als Marker für die Gesamtinfiltration der Lunge mit neutrophilen Granulozyten zeigen einen Anstieg über 24 Stunden. Jedoch wurde die Myeloperoxidase im Lungengewebe nach 4 Stunden nicht untersucht, da Vorversuche gezeigt haben, dass der Zeitraum nicht ausreichte, um Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Lungen erkennen zu können. Im Vergleich der beiden untersuchten LPS-Dosierungen untereinander wird eine Steigerung der Entzündungsparameter bei höheren Dosen deutlich.

Somit entspricht das untersuchte Modell gut den bisher beschriebenen Daten und ist akzeptabel für die Untersuchung der Mechanismen des akuten Lungenversagens.

4.2 Beeinflussung des akuten Lungenversagens durch Lipidemulsionen

4.2.1 Funktion von Lipidemulsionen in der parenteralen Ernährung

Lipidemulsionen zur parenteralen Ernährung werden in der klinischen Routine häufig bei Patienten eingesetzt. Sie sind essentieller Bestandteil der parenteralen Ernährung kritisch kranker Patienten in der Intensivmedizin. Sie dienen nicht nur als Kalorienlieferanten, sondern enthalten auch essentielle Fettsäuren. Diese fungieren als wichtige Bestandteile für den Aufbau und Erhalt von Zellmembranen sowie als Substrate für den Stoffwechsel. Die in den Lipidemulsionen enthaltenen Fettsäuren, wie z.B. Linolsäure, Eicosapentaensäure (EPA) oder auch Docosahexaensäure (DHA), werden im Körper metabolisiert und dienen als Substrate für den Eicosanoidstoffwechsel. Der Vorteil einer parenteralen Ernährung mit Lipidemulsionen liegt zum einen darin, dass im Vergleich zu einer Glukose-basierten parenteralen Ernährung die Liponeogenese reduziert und somit der Entstehung einer Fettleber vorgebeugt wird. Zum anderen könnte eine Glukose-basierte Infusion zu einer Hyperglykämie führen, die sich bei Intensivpatienten als nachteilig erwiesen hat [Van den Berghe et al. 2006]. Diese Hyperglykämie wird durch Infusion von Lipidemulsionen ebenfalls vermieden.

Auf Grund der Zusammensetzung der Lipidemulsionen und der darin enthaltenen Menge an n-3- und n-6-Fettsäuren und sowie ihrem Verhältnis zueinander, ist es außerdem möglich, Krankheitsparameter und den Verlauf einer Erkrankung zu beeinflussen. So zeigten unterschiedliche Arbeitsgruppen, dass es bei einer Zufuhr von n-3-Lipiden zu einer Modulation der Eicosanoidproduktion kommt [Koller et al. 2003; Wichmann et al. 2007]. Diese Ergebnisse bieten die Möglichkeit, Lipidemulsionen nicht nur zur Ernährung, sondern auch zu einer pharmakologischen Beeinflussung des Immunsystems zu nutzen und somit eine immun-modulierende Wirkung auszuüben.

4.2.2 Auswirkungen der unterschiedlichen Lipidemulsionen auf eine akute Lungenschädigung in der Maus

In dieser Arbeit wurden insbesondere die Auswirkungen der Anwendung einer Fischöl- im Vergleich mit einer Sojabohnenöl-basierten Lipidemulsion auf das LPS-induzierte Modell einer akuten Lungenschädigung in der Maus untersucht. Die Menge der applizierten Lipidemulsion entspricht einer Tagesdosis von 1,0 g Lipid pro kg/Körpergewicht. Die reguläre Nahrung stand den Mäusen weiterhin zur Verfügung. Beachtet werden muss allerdings, dass der Grundumsatz einer Maus etwa dreimal höher ist als der des Menschen. Somit liegt die am Tag den Mäusen zugeführte Menge an Lipiden an der unteren Grenze, entsprechend einer Empfehlung für Patienten, die 0,5–2,0 g Lipiden pro kg/Körpergewicht pro Tag als optimal bezeichnet [Ernährung 2006].

Die Transmigration von Leukozyten durch die endotheliale-epitheliale Barriere in das Lungengewebe und in die Alveolen wird durch Lipidemulsionen moduliert, wie in den Ergebnissen gezeigt wurde. Dieser komplexe und eng regulierte Vorgang wird auf unterschiedlichen Ebenen durch die n-3-Lipide beeinflusst. So führt sowohl eine verminderte Präsentation von endothelialen Adhäsionsmolekülen [Weber et al. 1995] sowie eine geringere Synthese des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) in Endothelzellen [Mayer et al. 2002b] zu einer geringeren Aktivierung der Integrine und somit zu einer Hemmung des Rollens der Leukozyten [Mayer et al. 2002b; Weber et al. 1995]. Dementsprechend sind die folgenden Schritte, Adhäsion und Transmigration, ebenfalls vermindert, was letztlich in der bei den Ergebnissen beschriebenen Reduktion der Anzahl der transmigrierten Leukozyten in den Alveolarraum unter Infusion mit n-3-Lipiden gegenüber der Kontrollgruppe resultiert. Im Gegensatz zu den Wirkungen der FO-basierten Lipidemulsion zeigte die SO-basierte Lipidemulsion entgegengesetzte Effekte: die Transmigration der Leukozyten unter dieser n-6-reichen Lipidemulsion war verstärkt (Abb. 20 + 21). Eventuell könnte dies mit einer vermehrten Synthese von PAF zusammenhängen. Nach Zufuhr von Arachidonsäure in Endothelzellen konnte *in vitro* eine Erhöhung der PAF-Synthese gezeigt werden. Dies führte zu einer verstärkten Expression und Bindungsmöglichkeit der Integrine [Mayer et al. 2002b]. Durch diese Ergebnisse

könnte ein verbessertes Rollen, nachfolgende Adhäsion und Transmigration in das umliegende Gewebe erklärt werden.

Um diese These zu bestätigen wurde bei den Experimenten versucht, PAF aus der BAL der infundierten Mäuse zu messen und zu bestimmen. Die Nachweisgrenze der benutzten Methode war jedoch zu hoch, um verwertbare Ergebnisse zu erzielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur die Zahl der Leukozyten in der Lunge bestimmt, sondern auch die Zahl der Leukozyten im peripheren Gefäßbett. Leukozyten können nach einem Infektionsstimulus vermehrt aus dem Knochenmark rekrutiert werden. Das in die Lunge eingebrachte Endotoxin bewirkt zum einen, dass die Leukozyten vermehrt in die Alveolen emigrieren, um dort die Noxe zu bekämpfen. Zum anderen werden die Leukozyten steifer und auf Grund der Größe und Beschaffenheit der Lungenkapillaren hängen sie dort physisch fest. Nach Stimulation mit LPS intratracheal findet man in der NaCl-Kontrollgruppe $3,6 \pm 0,9 \times 10^6/\text{ml}$ Leukozyten im Blutbild, die die im Blutkreislauf zirkulierenden Zellen widerspiegeln (Abb. 35). In der Gruppe mit der n-3-reichen Infusion wurden signifikant mehr Leukozyten im peripheren Blut gefunden ($8,0 \pm 1,2 \times 10^6/\text{ml}$). In Hinblick dazu wurden bei der Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität (Abb. 30) und der Anzahl der Leukozyten in der broncho-alveolären Lavage (Abb. 21) geringere Werte als bei den NaCl-infundierten Mäusen gemessen. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der mit einer n-6-reichen Lipidemulsion infundierten Mäuse. Es wurden weniger Leukozyten im peripheren Blut und signifikant mehr Leukozyten in der Lunge gefunden.

Analoge Ergebnisse erzielte die Arbeitsgruppe *Andonegui et al.*. Sie untersuchten die Verteilung der Leukozyten in unterschiedlichen Organen in Mäusen, die mit 0,5 mg/kg LPS i.p. (12,5 µg LPS/Maus) stimuliert wurden. Der Wert der gemessenen MPO-Aktivität im Lungengewebe stieg an, während die Zahl der Leukozyten, gemessen im M. cremaster als Parameter für die Leukozytenzahl in der Peripherie, über einen Zeitraum von 12 Stunden abnahm [Andonegui et al. 2003].

Nach einer LPS-Stimulation kommt es durch eine Kombination von endothelialen und leukozytären Antworten, wie beispielsweise der gesteigerten Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM), und eine „Versteifung“ der Leukozyten, zu einer vermehrten Adhäsion in der kapillären Strombahn und

Transmigration in das alveoläre Kompartiment. Dieser Vorgang könnte die periphere „Leukopenie“ erklären.

Auch bezüglich des „*vascular leakage*“ und des „*solvent drag*“ [Ehrhart and Hofman 1993] im Rahmen einer LPS-induzierten akuten Lungenschädigung kann eine Beeinflussung durch n-3- versus n-6-Lipidemulsionen festgestellt werden. Dies kann durch Messungen des Proteingehaltes in der broncho-alveolären Lavage charakterisiert werden. Befindet sich mehr Protein in der BAL, zeigt dies, dass der Schaden an der alveolo-kapillären Barriere größer ist und es durch „*vascular leakage*“ zu einem vermehrten Proteinübertritt und infolge des „*solvent drag*“ auch zu Flüssigkeitsansammlungen im Lungengewebe und in den Alveolen kommt [Ehrhart and Hofman 1993]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch die Instillation von LPS die Proteinkonzentration in der BAL stieg (Abb. 38 + 39). Für die Steigerung der Permeabilität der alveolo-kapillären Barriere sind unterschiedliche Mechanismen verantwortlich. Endotoxin bewirkt eine gesteigerte Synthese und Freisetzung des Zytokins TNF- α . TNF- α führt nun zum einen zu einer verstärkten Produktion des vasokonstriktorisch wirkenden Thromboxan A₂ (TxA₂). Des Weiteren kommt es zu einer Synthese von Prostaglandin E₂ (PGE₂), das die Permeabilität der Gefäße steigert. Weiterhin wirkt TNF- α selbst auf die „*tight junctions*“ der Gefäße und bewirkt zusätzlich eine vermehrte Produktion des pro-inflammatorisch wirkenden PAF. Alle genannten Mechanismen sind an der Erhöhung der Permeabilität beteiligt.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die gemessene Proteinkonzentration in der BAL bei den mit LPS stimulierten und mit n-3-reicher Lipidemulsion infundierten Mäusen im Vergleich zu der Proteinkonzentration in der BAL bei NaCl-infundierten Mäusen deutlich reduziert war (Abb. 38 + 39). Im Gegensatz dazu war die Konzentration des Proteins in der BAL der Mäuse, denen eine n-6-reiche Lipidemulsion infundiert worden war, sogar signifikant erhöht. Dadurch lässt sich eine verminderte Permeabilität der Lungengefäße unter n-3-Lipidinfusionen in Folge der LPS-Instillation ableiten.

In verschiedenen Studien wurde bislang gezeigt, dass TNF- α die epitheliale Schrankenfunktion beeinträchtigt. Schmitz *et al.* zeigten an einer Kolonkarzinomzelllinie, dass bereits 8 Stunden nach Gabe des Stimulus ein Effekt nachweisbar war [Schmitz *et al.* 1999]. Gitter *et al.* zeigten, dass die Zahl der Fasern,

die die „*tight junctions*“ bilden, durch Gabe von TNF- α reduziert wird. Dadurch wird die epitheliale Ionenleitfähigkeit und somit letztendlich die Permeabilität und dadurch die passive Diffusion von parazellulären Markern drastisch erhöht [Gitter et al. 2000]. Ferner wurde gezeigt, dass TNF- α die Adhäsion der Endothelzellen untereinander moduliert. Dies geschieht, indem TNF- α die $\alpha_v\beta_3$ -Integrine inaktiviert [Rotundo et al. 2002].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine differentielle Beeinflussung in der Synthese des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α durch Lipidemulsionen (Abb. 46 + 47). TNF- α könnte somit auch hier ursächlich für die Steigerung und die Modulation der Gefäßpermeabilität durch Lipidemulsionen sein.

In diesen Experimenten wurden weder die Prostanoiden TxA₂ und PGE₂ noch PAF gemessen, sodass ich über diese nachgeschalteten Mechanismen des „*vascular leakage*“ keine Aussage treffen kann.

Eine Hypothese des protektiven Effektes der n-3-Lipide im Bezug auf „*vascular leakage*“ und „*solvent drag*“ könnte in dem Metabolismus der Eicosanoide begründet sein. Es wurde gezeigt, dass Eicosanoide wie PGE₂ und TxA₂ zu einer erhöhten Epitheldurchlässigkeit führen [Arakawa et al. 1993; Lotvall et al. 1992; Svensjo and Grega 1986]. Die Fettsäure EPA führt zu einer vermehrten Bildung von PGE₃, das wiederum eine geringere Permeabilitätserhöhung im Vergleich zum PGE₂ bewirkt. Zusätzlich wird durch die Metabolisierung von EPA zu PGE₃ weniger PGE₂ gebildet [Lu et al. 2007; Santoli and Zurier 1989; Yang et al. 2004]. Auch der Arachidonsäuremetabolit TxA₂ spielt eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang, indem er die pulmonal-kapilläre Permeabilität erhöht [Seeger et al. 1991]. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Metaboliten der n-3-Lipide eine große Rolle in der Protektion der vaskulären Permeabilität spielen. Allerdings müssten, um für diese Experimente eine Aussage treffen zu können, weitere Messungen und Untersuchungen vorgenommen werden.

4.2.3 Modulation der Zytokin-Synthese durch Lipidemulsionen

Aus der BAL wurden die Zytokine TNF- α und MIP-2 gemessen. Wiederum zeigte sich, dass unter der FO-basierten Lipidemulsion die Konzentration der Zytokine vermindert

war, während bei den Mäusen, denen eine SO-basierte Lipidemulsion infundiert worden war, erhöhte Konzentrationen beider Zytokine in der BAL gefunden wurden (Abb. 46, 47, 49 + 50).

Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in anderen Experimenten gezeigt werden. In einer Studie wurde septischen Patienten eine n-3-, bzw. eine n-6-basierte Lipidemulsion über 5 Tage infundiert. Danach wurden Monozyten isoliert, *in vitro* stimuliert und anschließend die Zytokinkonzentration gemessen. Bei Infusion mit den konventionellen n-6-basierten Lipidemulsionen zeigte sich ein Anstieg der TNF- α -, IL-1-, IL-6- und IL-8-Synthese. Dagegen resultierte eine intravenöse Administration einer n-3-reichen Lipidemulsion in einer geringeren Bildung dieser pro-inflammatorischen Zytokine in den isolierten mononukleären Zellen [Babcock et al. 2002; Mayer et al. 2003b]. Auch bei enteraler Zufuhr von Kapseln, die Fischöllipide enthalten, zeigten sich vergleichbare Effekte. Allerdings konnten die Ergebnisse erst nach einer über mehrere Wochen andauernden oralen Zufuhr von Fischölkapseln in Probanden gefunden werden [Endres et al. 1989].

Die Veränderungen in der Zytokinsynthese bei Gabe der unterschiedlichen Lipidemulsionen bzw. Darreichungsformen in den diversen Experimenten lassen sich dadurch erklären, dass die n-3-Fettsäuren EPA und DHA Arachidonsäure in der Zellmembran ersetzen. In neutrophilen Granulozyten wurde gezeigt, dass eine Anreicherung der Membran mit n-3-Fettsäuren einen hemmenden Effekt auf die Aktivität der Phospholipase A₂ und der Phospholipase C haben kann [Sperling et al. 1993]. Auch Auswirkungen auf nachfolgende Signalkaskaden, Veränderungen in der Bildung sekundärer Botenstoffe, wozu auch die Synthese des Plättchen-aktivierenden Faktors zählt, sowie auf den Calciumeinstrom können ausgelöst werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass es durch Präinkubation mit Fettsäuren *in vitro* zu einem Einbau von EPA oder DHA in die Zellmembran kommen kann. Dies resultiert in einer Verminderung der durch Endotoxin stimulierten Aktivierung des Nukleären Faktors- κ B (NF- κ B) [Denys et al. 2005]. Nachfolgend kommt es zu einer Reduzierung der TNF- α -Synthese [Lo et al. 1999]. Zusätzlich beschrieben *Camandola et al.*, dass NF- κ B als ein zentrales Element des Entzündungsmetabolismus durch AA, nicht aber durch EPA, aktiviert wird [Camandola et al. 1996]. Von DHA wurde berichtet, dass es die TNF- α vermittelte Aktivierung des NF- κ B mindert [Weber et al. 1995].

Diese unterschiedlichen Ansätze könnten eine Erklärung für die verminderte Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine unter dem Einfluss der n-3-Lipide sein.

4.2.4 Mechanismen der protektiven Wirkung der n-3-Lipide

Die Mechanismen des protektiven Effektes der n-3-Lipide bezüglich der Inflammation sind einerseits auf die verminderte Zytokinsynthese, andererseits auf eine Verschiebung zu Gunsten der Bildung von weniger pro-inflammatorischen Lipidmediatoren, wie beispielsweise Leukotrien (LT) B_5 anstelle von LTB_4 , zurückzuführen. Auch eine Reduzierung der Synthese des Plättchen-aktivierenden Faktors sowie eine verminderte Adhäsion der Leukozyten an den Endothelzellen tragen zu der beschriebenen protektiven Wirkung der n-3-Lipide bei [Grimminger et al. 2000; Mayer et al. 2002b].

Eine weitere Hypothese zu den anti-inflammatorischen Wirkungen ist die Bildung von bioaktiven Mediatoren aus Fettsäuren, wie beispielsweise der Lipoxine, Resolvine, Docosatriene und Neuroprotectine [Arita et al. 2005; Marcheselli et al. 2003]. Lipoxine entstehen aus Arachidonsäure durch eine zweifache Oxygenierung. Dabei ist die Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten wichtig, da diese das benötigte Enzym 5-Lipoxygenase besitzen. Resolvine der E-Serie (Resolvin E1 oder RvE1) sind Metabolite der Eicosapentaensäure. Hierbei steht Resolvin für „*resolution phase interaction products*“. Der Begriff „*Resolvin*“ wurde geprägt, da dieses Produkt erstens in der Resolutionsphase einer Entzündung gefunden wird, zweitens als ein zwischen Zellen wechselwirkendes biosynthetisches Produkt erscheint und drittens sich insbesondere als potenter Regulator der Granulozyten in einer Entzündung *in vivo* zeigt [Serhan 2005]. Diese Mediatoren wirken anti-inflammatorisch und immunregulatorisch, reduzieren die Neutrophilen-Migration und vermindern das Ausmaß einer Entzündungsantwort [Serhan 2005; Serhan et al. 2002].

So könnte insbesondere die anti-inflammatorische Wirkung der verwendeten n-3-reichen Lipidemulsion in dem Metabolismus der darin enthaltenden Fettsäuren EPA und DHA zu Resolvinen begründet sein, da die Bildung dieser Produkte zur Auflösung der Entzündung beiträgt.

4.3 Einfluss des PAF-Rezeptors auf die immunmodulatorische Wirkung der Lipidemulsionen im akuten Lungenversagen

4.3.1 Effekte des PAF-PAF-Rezeptor-Systems im akuten Lungenversagen der Maus

Um die Wirkung des PAF-PAF-Rezeptor-Systems zu untersuchen, standen als weitere Versuchsgruppen PAF-Rezeptor-Knock Out-Tiere zur Verfügung. Bei diesen wurde der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF)-Rezeptor genetisch deletiert. Weiterhin wurden Wildtyp-Mäuse untersucht, denen 30 min vor Instillation von LPS der PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52321 intravenös injiziert wurde.

In beiden Versuchsgruppen wurden ähnliche Werte verglichen mit den Wildtyp-Mäusen ermittelt. Trotz der Ausschaltung des PAF-PAF-Rezeptor-Signalweges oder Injektion des PAF-Rezeptor-Antagonisten wurde im Vergleich zum Wildtyp eine ähnliche Leukozytenanzahl in der BAL als auch im Lungengewebe gefunden (Abb. 25, 26, 27, 28, 32 + 33). *Bussolino et al.* zeigten in ihren Versuchen, dass PAF die Affinität zwischen den verschiedenen Adhäsionsmolekülen der Leukozyten und Endothelzellen steigert. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der Adhäsion und nachfolgender Transmigration der Zellen. Des Weiteren stimuliert PAF die Migration der Leukozyten und eine Formveränderung der Endothelzellen durch eine Erhöhung des Calcium-Einstromes. Somit präsentierten sie, dass PAF eine große Rolle in der Transmigration der Leukozyten spielt [Bussolino and Camussi 1995]. Jedoch konnten in dem hier untersuchten Modell signifikante Unterschiede in der Zahl der Leukozytentransmigration nicht demonstriert werden (Abb. 29). Daraus kann eine kompensatorische alternative Immunantwort vermutet werden.

In meinem Modell war – sowohl nach Injektion des PAF-Rezeptor-Antagonisten, als auch in der Gruppe mit der Deletion des PAF-Rezeptors - tendenziell eine geringere Anzahl von Leukozyten in der BAL nachweisbar (Abb. 25, 26, 27 + 28). Demgegenüber konnten geringgradig höhere Werte der MPO-Aktivität gemessen werden (Abb. 32 + 33), entsprechend einer höheren Anzahl von Leukozyten im Gewebe. Möglicherweise könnte durch das Fehlen des PAF-Rezeptors ein Schritt in dieser Transmigrationskaskade zwischen den Gefäßen und den Alveolen vermindert

sein. Dieser Schritt könnte entweder in der Emigration aus dem Gefäß oder in der Invasion in die Alveolen lokalisiert sein. Momentan ist nicht genauer zu beurteilen, wo explizit diese Restriktion liegt, da in den Experimenten nur die Leukozyten in den Alveolen und in der Gesamtlunge gemessen wurden, nicht aber die Leukozyten in den Lungengefäßen, bzw. auch keine histologischen Untersuchungen vorgenommen wurden.

Ebenfalls zeigten die ermittelten Werte der Proteinkonzentration (Abb. 41, 42, 43 + 44) und der Zytokine TNF- α (Abb. 52, 53, 56 + 57) und MIP-2 (Abb. 54, 55 + 60) in beiden Gruppen, in denen der PAF-PAF-Rezeptor-Signalweg ausgeschaltet wurde, ähnlich hohe Werte wie bei den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen. Einzig wurden Abweichungen in der Messung des Zytokins MIP-2 nach einer intratrachealen Gabe von 1 μ g LPS bei den Mäusen gefunden, die den PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021 erhielten (Abb. 59). Hier waren sämtliche ermittelten Werte in den drei Infusionsgruppen signifikant vermindert, verglichen mit den Wildtyp- und den PAF-Rezeptor-KO-Mäusen.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine Entzündungsantwort auf den Stimulus LPS in meinen Versuchen erhalten war.

Weiterhin kann vermutet werden, dass es bei den PAF-R-KO-Mäusen zu Kompensationsmechanismen für den funktionell inaktiven Aktivierungsweg kommt. Eine intakte Immunantwort im endotoxinämischen Schockmodell bei den PAF-Rezeptor-KO-Mäusen wurde bereits gezeigt [Ishii et al. 1998]. Trotz Fehlen des PAF-Rezeptor-Systems sind die Mäuse in der Lage, mit einer adäquaten Entzündungsantwort zu reagieren [Ishii et al. 1998; Schaefer et al. 2007]. In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass es bei einer intraperitonealen Stimulation mit LPS bei Mäusen mit genetischer Deletion des PAF-Rezeptors zu einer dreimal so hohen Konzentration des chemotaktisch wirkenden Zytokins MIP-2 kommt, verglichen mit den WT-Mäusen [Schaefer et al. 2007]. Möglicherweise stellt die Steigerung des chemotaktisch-wirkenden Zytokins MIP-2 einen Kompensationsmechanismus der PAF-R-KO-Tiere dar.

In Studien wurde gezeigt, dass der PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021 *in vitro* in der Monozyten-Zelllinie U937 die Konzentrationen der Zytokine IL-1 β und TNF- α im

Überstand signifikant verminderte [Ou-Yang et al. 2005]. *Nie et al.* zeigten, dass BN 52021 in der Lage ist, eine NF- κ B-Aktivierung und eine TNF- α -Produktion in verschiedenen Ratten-Leukozytenpopulationen zu hemmen [Nie et al. 2004]. Auch in *in vivo*-Studien wurde eine Beeinflussung der Entzündungsantwort bei Gabe des PAF-Rezeptor-Antagonisten belegt. So zeigten *Poveshchenko et al.* sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Verminderung der Immunantwort bei Gabe von BN 52021. Sie demonstrierten eine Abnahme der Phagozytoseeigenschaften von Peritonealmakrophagen und eine verringerte Produktion der Prostanoiden PGB₂ und LTB₄ nach der Gabe des PAF-Rezeptor-Antagonistes BN 52021 [Poveshchenko and Kozlov 1999]. Eine transiente Blockade des PAF-Rezeptor-Systems scheint diesen Experimenten nach effektiv zu einer Hemmung der LPS-induzierten Inflammation zu führen.

Bei den hier vorliegenden Experimenten eines akuten Lungenversagens am Mausmodell konnten die signifikanten Verminderungen der Immunantwort nicht gezeigt werden. Möglicherweise könnte die Ursache darin liegen, dass der PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021 intravenös gegeben wurde, LPS hingegen intratracheal appliziert wurde. Auch wurde der Antagonist einmalig in einer Dosis von 10mg/kg Körpergewicht 30 min vor LPS-Gabe injiziert. Eventuell könnte eine höhere Gabe oder eine wiederholte Injektion des Gingkolids die Ergebnisse beeinflussen und die Entzündungsantwort signifikant vermindern.

4.3.2 Wirkung von Lipidemulsionen auf die Entzündung in Abhängigkeit des PAF-PAF-Rezeptor-Systems

Die bisher beschriebenen Effekte der Modulation der pulmonalen Inflammation durch n-3-basierte bzw. n-6-basierte Lipidemulsionen waren sowohl bei den PAF-R-KO-Mäusen als auch bei den Mäusen mit pharmakologischer Inhibition des PAF-Rezeptors nicht nachweisbar. Dabei waren alle untersuchten Aspekte des Lungenversagens betroffen.

Zeigten sich bei den Wildtypen höheren Werte in der Zahl der transmigrierten Leukozyten in die Lunge bei Infusion der SO-basierten Lipidemulsion, war dieser Effekt bei den Mauslinien mit Deletion des PAF-Rezeptors und mit pharmakologischer Inhibition nicht mehr erkennbar. Auch die Effekte, der bei Infusion der FO-

Lipidemulsion in den Wildtypen gefunden wurden, waren sowohl in den genetisch veränderten Mäusen (PAF-R-KO) als auch unter pharmakologischer Inhibition (PAF-RA) komplett aufgehoben.

Auch die Unterschiede der anderen untersuchten Parameter nach der Infusion der verschiedenen Lipidemulsionen, wie etwa die Proteinextravasation in die Lunge oder die Bildung der Zytokine TNF- α und MIP-2, waren vollständig in beiden Gruppen der Mäuse, denen der PAF-Rezeptor inhibiert worden war, nicht mehr sichtbar.

Diese Daten stützen die Hypothese, dass das PAF-PAF-Rezeptor-System an den Signalwegen der immun-modulatorischen Wirkung der Lipidemulsionen im Mausmodell wesentlich beteiligt ist.

4.3.2.1 Mechanismen der Modulation der Lipid-abhängigen Effekte durch den PAF-Rezeptor

Göggel et al. zeigten, dass PAF und LPS eine pulmonale Inflammation und Ödembildung fördern sowie zur Aktivierung des Cyclooxygenase führen, welche wiederum die Synthese der Arachidonsäure-abhängigen Prostanoiden nach sich zieht [Göggel et al. 2004]. Spekulieren lässt sich nun, ob durch das Fehlen des Plättchen-aktivierenden Faktor-Rezeptors auch die Cyclooxygenase in einem geringeren Maße aktiviert wird. Dadurch könnte es zu einer geringeren Synthese von AA-, aber auch EPA-abstammenden Prostanoiden kommen - dies würde konsekutiv zu einer Verringerung der n-6 und n-3 ausgelösten Effekte führen.

Einen weiteren Erklärungsansatz bildet die Synthese des PAF. Von der Arbeitsgruppe *Mayer et al.* wurde gezeigt, dass zum einen n-3 Lipide eine geringere Synthese, andererseits n-6 Lipide eine erhöhte PAF-Synthese in Endothelzellen bewirken [Grimminger et al. 2000; Mayer et al. 2002b].

Da PAF nun aber, egal ob in geringer oder hoher Menge vorhanden, nicht an seinen Rezeptor binden kann, da dieser entweder deletiert oder antagonisiert ist, verliert der Organismus die Fähigkeit, über die Menge des gebildeten PAF typische Reaktionen hervorzurufen. Die Folge ist, dass der Reaktionsweg nicht beschritten wird und damit die Effekte über das PAF-PAF-Rezeptor-System nicht ausgeübt werden können.

Es lässt sich nur spekulieren, aus welchem Grund die divergierenden Effekte der Fettsäuren bei den PAF-R-KO- und PAF-RA-Mäusen aufgehoben sind. Letztendlich müssten weitere Experimente beispielsweise mit der Messung von Prostanoiden und der Bildung von PAF durchgeführt werden.

4.3.3 PAF-PAF-Rezeptor-System und akutes Lungenversagen – Unterschiede der Wirkung bei Mäusen und Menschen

In diesen Versuchen wurde bewiesen, dass Mäuse, die eine Deletion in dem PAF-Rezeptor Gens aufweisen (PAF-R-KO) und auch Mäuse, bei denen der Signalweg mittels eines PAF-Rezeptor-Antagonisten unterbrochen wurde (PAF-RA), eine adäquate Immunantwort auf eine LPS-Instillation in die Lunge zeigten (Abb. 25, 26, 27, 28, 41, 42, 43, 44, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 + 60). Eine intakte Immunantwort der PAF-R-KO-Mäuse im endotoxämischen Schockmodell wurde ebenfalls bereits von *Ishii et al.* gezeigt [Ishii et al. 1998].

4.3.3.1 PAF-PAF-Rezeptor-System als pharmakologische Intervention im Menschen

Verschiedene andere Arbeitsgruppen konnten jedoch zeigen, dass Versuche mit PAF-Rezeptor-Antagonisten zu einer verminderten Entzündungsantwort führten [Nie et al. 2004; Poveshchenko and Kozlov 1999]. Daraus abgeleitet wurden pharmakologische Studien an Patienten durchgeführt.

Beim Menschen scheint ein PAF-Rezeptor-Antagonist jedoch nicht wirksam zu sein. In Phase-III-Studien an septischen Patienten und Patienten mit akutem Lungenversagen übte der Einsatz eines PAF-Rezeptor-Antagonisten keinen Einfluss auf die Überlebensrate aus [Christman et al. 1990; Dhainaut et al. 1998; Mathiak et al. 1997].

Berücksichtigt werden muss allerdings, dass eine unterschiedliche Studienplanung zwischen Experimenten und klinischen Studien zugrunde liegt. Bei Experimenten werden Entzündungen meistens mit einem gereinigten Endotoxin ausgelöst. Dieser Stimulus wird häufig nur einmalig verabreicht und soll eine lokale Reaktion auslösen. In Studien werden meistens Patienten untersucht, die an einer systemisch

verlaufende Sepsis, septische Erkrankung oder Lungenversagen leiden. Diese Erkrankungen entstehen oft polymikrobiell beispielsweise bei einer Perforation des Darmes und ihr „Startzeitpunkt“ kann nicht wie in einem Experiment exakt definiert werden.

Zudem wurde bei den durchgeführten Versuchen der PAF-Rezeptor-Antagonist vor dem Stimulus injiziert. Auch dies stellt eine im klinischen Alltag nicht durchführbare Option dar. Zudem könnten möglicherweise Unterschiede bei *in vivo* -Experimenten in Nagern hinsichtlich des Metabolismus und der Organfunktionen, wie beispielsweise des Caecums, zu der unterschiedlichen Wirksamkeit der PAF-Rezeptor-Antagonisten beigetragen haben.

4.4 Ausblick: Modulation einer Inflammation durch parenterale Ernährung - klinische Anwendungsmöglichkeiten

Neben der Anwendung in der klinischen Ernährung bieten sich weitere Möglichkeiten der Nutzung von Lipidemulsionen an. Im Hinblick auf die gezeigten immunmodulatorischen Effekte könnten Lipidemulsionen präventiv eingesetzt werden, wie z.B. bei Operationen. Mit diesem Konzept wäre eine klinische pharmakologische Intervention zur Prävention einer überschießenden Immunreaktion nach Operationen möglich, wenn eine parenterale Ernährung der Patienten angezeigt ist. Darüber hinaus könnte die Trennung von Ernährung und Immunmodulation zu einer breiteren Nutzung des Konzeptes an größeren Patientenkollektiven führen.

Zudem bietet sich die Möglichkeit, die Ernährung von kritisch kranken Patienten mit einer pharmakologischen Intervention zu verbinden. Als Beispiel könnte der Einsatz von n-3-reichen Lipidemulsionen bei Intensivpatienten eine zusätzliche entzündungshemmende Therapie bedeuten.

Argumente eines präventiven Einsatzes von Lipidemulsionen lieferte *Wichmann et al.* in einer Studie. Dort erhielt eine Gruppe von Patienten *post operationem* eine Mischung aus LCT/MCT/Fischöl als parenterale Ernährung. Es wurde gezeigt, dass in dieser Gruppe der Klinikaufenthalt nach einer abdominalen Operation verkürzt werden konnte [Wichmann et al. 2007]. Auch *Heller et al.* demonstrierten in einer

Studie an chirurgischen Patienten, dass durch die Infusion einer n-3-reichen Lipidemulsion sowohl die Antibiotikagabe als auch die Mortalität verringert und der Klinikaufenthalt verkürzt werden konnte [Heller et al. 2006]. Zu beachten ist jedoch, dass sich bei dieser Studie die Mortalität und die Dauer des Klinikaufenthaltes auf einen rechnerisch erstellten Wert im Rahmen einer Datenbank-Analyse beziehen und es sich nicht um eine kontrollierte Studie handelt.

Lipidemulsionen werden zudem bei kritisch kranken Patienten, z.B. im ARDS oder während einer Sepsis, eingesetzt. Nachteilig hat sich die Infusionsgeschwindigkeit der Lipidemulsion gezeigt. *Suchner et al.* untersuchte in einer Studie die Auswirkung der Infusionsgeschwindigkeit auf verschiedene lungenspezifische Funktionen. Eine zu schnelle Infusion konventioneller Lipidemulsionen verschlechterte diese Parameter. Als Grund führte *Suchner et al.* die Überlastung von „*lipid-clearing*“ Mechanismen an [Suchner et al. 2001]. Damit kam es zu einer gesteigerten Verfügbarkeit von n-6 Fettsäuren und folglich zu einer gesteigerten Bildung von Prostanoiden. Eine weitere Studie zeigte, dass eine zu schnelle Infusion einer Emulsion bei ARDS-Patienten sowohl zu einer erhöhten Konzentration von PAF in der BAL als auch zu einer erhöhten Anzahl von neutrophilen Granulozyten in der BAL führte [Lekka et al. 2004]. Beide Studien sind insofern von zentraler Bedeutung, da sie negative Effekte der zurzeit standardmäßig verwendeten Lipidemulsionen zeigen.

Demgegenüber stehen die positiven Effekte der Lipidemulsionen, besonders der, die mit n-3 Lipide angereichert sind [Grimm et al. 2006; Heller et al. 2006].

In weiteren Studien wurde die Anwendung von enteral zugeführten Lipiden bei Patienten mit ARDS untersucht. In groß angelegten Studien konnten sowohl *Gadek et al.* als auch *Singer et al.* zeigen, dass die Anwendung einer auf Fischöl-basierten enteralen Ernährung sowohl die Zytokinkonzentration in der Lunge verringerte als auch den Gasaustausch verbesserte und die Beatmungszeit der Intensivpatienten verkürzte [Gadek et al. 1999; Pacht et al. 2003; Pontes-Arruda et al. 2006; Singer et al. 2006].

Es existieren jedoch keine Leitlinien zu dem Einsatz von Lipidemulsionen mit dem Ziel der Immunmodulation, da der Zeitpunkt und die Dosierung der Lipidemulsionen während einer Entzündung oder Sepsis gegenwärtig ungeklärt sind. Ein n-3/n-6

Verhältnis von 7,6 : 1 (Fischöl) oder 1 : 370 (Distelöl) löste eine Immunsuppression in einem Herztransplantationsmodell aus [Grimm et al. 1994]. Die Anwendung einer n-6-reichen Lösung (Verhältnis 1 : 6,4) bei septischen Patienten erhöht die Zytokinantwort [Mayer et al. 2003c]. Ein Verhältnis von 1 : 2 zeigte eine nur geringe Auswirkung auf die Immunität in dem Herztransplantationsmodell der Arbeitsgruppe um *Grimm et al.* [Grimm et al. 1994]. Durch Anwendung eines n-3/n-6 Verhältnisses von 1 : 2 bis 1 : 3 könnten daher pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Effekte vermieden werden. Die anti-inflammatorische Wirkung einer n-3-reichen Lösung könnte bei einer Entzündung therapeutischen Nutzen haben, in der Phase der mangelnden Immunantwort jedoch kontraproduktiv sein. Dennoch zeigte die oben angeführte Studie von Heller an 661 Patienten, die auch 276 septische Patienten einschloss, dass eine Ergänzung der parenteralen Ernährung mit 0,1–0,2 g/kg/d Fischöl positive Effekte auf die Mortalität, die Infektionsrate und die Länge des Klinikaufenthaltes hatte [Heller et al. 2006].

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell einer LPS induzierten akuten Lungenschädigung in der Maus ist in vielen Parametern von der Situation der Patienten mit Sepsis und der ARDS-Patienten abweichend, zeigt jedoch auch Überschneidungen. Physiologische Mechanismen wie Transmigration oder „*vascular leakage*“ können gut untersucht werden. Insbesondere der anti-inflammatorische Effekt der n-3-Lipide kann in diesem Modell in Anlehnung an die Situation im Intensivpatienten erforscht werden. Auf dieser Grundlage bildet es ein solides Modell, um die Effekte der Lipidemulsionen und des PAF-Rezeptors zu untersuchen, um detaillierte Auskünfte über die involvierten Mediatoren und den zeitlichen Verlauf des Einflusses auf den Verlauf der Entzündung zu erforschen. Dies ist ein essentieller Teilschritt auf dem Weg zum Einsatz von Lipidemulsionen zur immunmodulatorischen Therapie bei Patienten mit Sepsis und ARDS.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Arbeit neben den immunmodulatorischen Effekten der n-3- und n-6-Lipide insbesondere die Notwendigkeit des PAF-PAF-Rezeptorsystems für diese Effekte zeigt und somit zur weiteren Aufklärung der Bedeutung von Lipidemulsionen und des PAF-PAF-Rezeptorsystems während einer Entzündungsreaktion beiträgt.

5 Zusammenfassung

Sojabohnenöl (SO)-basierte Lipidemulsionen werden weltweit auf Intensivstationen zur parenteralen Ernährung kritisch kranker Patienten eingesetzt. Die Wirkungen von Lipidemulsionen auf ein Lungenversagen sind bisher nur unzureichend erforscht. In einem Mausmodell der akuten Lungenschädigung wurde die immun-modulatorische Wirkung von SO- und Fischöl (FO)-basierten Lipidemulsionen sowie der Einfluss des PAF–PAF-Rezeptor-Systems im LPS-induzierten akuten Lungenversagen der Maus untersucht.

Die Ergebnisse belegen einen anti-inflammatorischen Effekt der infundierten FO-basierten Lipidemulsion in diesem Modell. Dies zeigte sich insbesondere in einer Reduktion der Transmigration der Leukozyten in den Alveolarraum und in einer niedrigeren MPO-Aktivität in dem Lungengewebe. Zusätzlich waren die Konzentrationen von Protein, als Anzeichen auf eine Schädigung der endothelialen-epithelialen Barriere, und inflammatorisch wirksamer Zytokine in der broncho-alveolären Lavage (BAL) signifikant verringert. Im Vergleich dazu verstärkten die SO-basierten Lipidemulsionen die Entzündungsreaktionen. Sie erhöhten die Leukozytenanzahl in der Lunge und die MPO-Aktivität im Lungengewebe, die Proteinkonzentration und die Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine in der BAL.

Die Experimente an den PAF-Rezeptor-KO-Mäusen und den Tieren, denen der PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021 injiziert wurde, zeigten, dass die immun-modulatorische Wirkung der Lipidemulsionen an ein intaktes PAF–PAF-Rezeptor-System gebunden ist.

Die Infusion von Lipidemulsionen sollte daher nicht nur als Zufuhr von Kalorien betrachtet werden, sondern kann ebenfalls die Entzündungsreaktion kritisch kranker Patienten beeinflussen.

Die vorgestellten tierexperimentellen Befunde stellen einen Beitrag zu einem verbesserten Verständnis der immun-modulierenden Wirkung von Lipidemulsionen und somit zu der Möglichkeit eines an die Entzündungsreaktion adaptierten Einsatzes auf Intensivstationen dar.

6 Summary

Soybean oil (SO)-based lipid emulsions are used for the parenteral nutrition of critically ill patients in intensive care units worldwide. The impact of these lipid emulsions in acute lung injury is only insufficiently investigated. In a murine model of acute lung injury the immune modulatory effects of SO- and fish oil (FO)-based lipid emulsions as well as the influence of the PAF–PAF-receptor system were studied.

The results demonstrated an anti-inflammatory effect of infused FO-based lipid emulsions in this model. This is shown in a reduction of transmigrated leukocytes into the alveolar space and a lower MPO activity in lung tissue. The concentration of protein in the bronchoalveolar lavage (BAL), serving as an indicator of damage to the endothelial-epithelial barrier, was attenuated. Additionally, the concentrations of inflammatory active cytokines were markedly decreased, too. In contrast, SO-based lipid emulsions enhanced the inflammatory response. They augmented the number of leukocytes in the BAL and the MPO activity in lung tissue. Furthermore, the concentrations of protein and pro-inflammatory cytokines in the BAL were increased. The experiments in PAF-receptor-KO mice and in mice pre-treated with the PAF-receptor-antagonist BN 52021 showed an essential dependency of the immune modulatory effect of lipid emulsions on an intact PAF–PAF-receptor-system.

Administration of lipid emulsions therefore should not only be regarded as a simple supply of calories but may also modulate the inflammatory response in critically ill patients.

The experimental findings presented contribute to a better comprehension of the immune modulating effects of lipid emulsions and offer the possibility for an adapted application in intensive care units.

7 Literaturverzeichnis

- Albrecht DM, van Ackern K, Bender HJ, Hof H, Kox W, Victor N, Funk P, Kieser M, Kohler S, Krausch D et al. 2004. Efficacy and Safety of the Platelet-Activating Factor Receptor Antagonist BN 52021 (Ginkgolide B) in Patients with Severe Sepsis : A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicentre Trial. *Clin Drug Investig* 24(3):137-47.
- Andonegui G, Bonder CS, Green F, Mullaly SC, Zbytnuik L, Raharjo E, Kubes P. 2003. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest* 111(7):1011-20.
- Arakawa H, Lotvall J, Kawikova I, Lofdahl CG, Skoogh BE. 1993. Leukotriene D4- and prostaglandin F2 alpha-induced airflow obstruction and airway plasma exudation in guinea-pig: role of thromboxane and its receptor. *Br J Pharmacol* 110(1):127-32.
- Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, Blumberg RS, Serhan CN. 2005. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(21):7671-6.
- Aukland K, Reed RK. 1993. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev* 73(1):1-78.
- Babcock TA, Helton WS, Hong D, Espat NJ. 2002. Omega-3 fatty acid lipid emulsion reduces LPS-stimulated macrophage TNF-alpha production. *Surg Infect (Larchmt)* 3(2):145-9.
- Bauer P, Lush CW, Kvietys PR, Russell JM, Granger DN. 2000. Role of endotoxin in the expression of endothelial selectins after cecal ligation and perforation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278(5):R1140-7.
- Baxter F. 1997. Septic shock. *Can J Anaesth* 44(1):59-72.
- Bazan NG, Squinto SP, Braquet P, Panetta T, Marcheselli VL. 1991. Platelet-activating factor and polyunsaturated fatty acids in cerebral ischemia or convulsions: intracellular PAF-binding sites and activation of a fos/jun/AP-1 transcriptional signaling system. *Lipids* 26(12):1236-42.
- Bazil V, Strominger JL. 1991. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol* 147(5):1567-74.
- Beasley D, Cohen RA, Levinsky NG. 1989. Interleukin 1 inhibits contraction of vascular smooth muscle. *J Clin Invest* 83(1):331-5.

- Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG. 1972. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J Exp Med* 136(6):1356-77.
- Benveniste J, Le Couedic JP, Polonsky J, Tence M. 1977. Structural analysis of purified platelet-activating factor by lipases. *Nature* 269(5624):170-1.
- Bialy J. 2000. Neues Diagnoseverfahren des akuten Lungenversagens. *Nachrichten-Forschungszentrum Karlsruhe* 32(1-2/2000):15-18.
- Bone RC. 1996. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 24(1):163-72.
- Braquet P, Touqui L, Shen TY, Vargaftig BB. 1987. Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacol Rev* 39(2):97-145.
- Bussolino F, Camussi G. 1995. Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties. *Eur J Biochem* 229(2):327-37.
- Calder PC. 2006. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83(6 Suppl):1505S-1519S.
- Camandola S, Leonarduzzi G, Musso T, Varesio L, Carini R, Scavazza A, Chiarotto E, Baeuerle PA, Poli G. 1996. Nuclear factor kB is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 229(2):643-7.
- Casals-Stenzel J. 1987. Effects of WEB 2086, a novel antagonist of platelet activating factor, in active and passive anaphylaxis. *Immunopharmacology* 13(2):117-24.
- Chase PB, Yang JM, Thompson FH, Halonen M, Regan JW. 1996. Regional mapping of the human platelet-activating factor receptor gene (PTAFR) to 1p35-->p34.3 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 72(2-3):205-7.
- Chen G, Goeddel DV. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296(5573):1634-5.
- Christman BW, Lefferts PL, Blair IA, Snapper JR. 1990. Effect of platelet-activating factor receptor antagonism on endotoxin-induced lung dysfunction in awake sheep. *Am Rev Respir Dis* 142(6 Pt 1):1272-8.
- Coyne CB, Vanhook MK, Gambling TM, Carson JL, Boucher RC, Johnson LG. 2002. Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol Biol Cell* 13(9):3218-34.

- Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P. 1989. Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med* 17(10):975-8.
- Delayre-Orthez C, Becker J, Guenon I, Lagente V, Auwerx J, Frossard N, Pons F. 2005. PPARalpha downregulates airway inflammation induced by lipopolysaccharide in the mouse. *Respir Res* 6:91.
- Denys A, Hichami A, Khan NA. 2005. n-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C-alpha and -epsilon and the NF-kappaB signaling pathway. *J Lipid Res* 46(4):752-8.
- Desouza IA, Hyslop S, Franco-Penteado CF, Ribeiro-DaSilva G. 2002. Evidence for the involvement of a macrophage-derived chemotactic mediator in the neutrophil recruitment induced by staphylococcal enterotoxin B in mice. *Toxicon* 40(12):1709-17.
- Despopoulos AS, Stefan. 2007. Taschenatlas Physiologie: Thieme.
- Dhainaut JF, Tenaillon A, Hemmer M, Damas P, Le Tulzo Y, Radermacher P, Schaller MD, Sollet JP, Wolff M, Holzapfel L et al. 1998. Confirmatory platelet-activating factor receptor antagonist trial in patients with severe gram-negative bacterial sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. BN 52021 Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med* 26(12):1963-71.
- Ehrhart IC, Hofman WF. 1993. Segmental vascular pressures in lung embolism. *J Appl Physiol* 74(5):2502-8.
- Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, Cannon JG, Rogers TS, Klempner MS, Weber PC et al. 1989. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med* 320(5):265-71.
- Engelberts I, Moller A, Leeuwenberg JF, van der Linden CJ, Buurman WA. 1992. Administration of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) inhibitors after exposure to TNF alpha prevents development of the maximal biological effect: an argument for clinical treatment with TNF alpha inhibitors. *J Surg Res* 53(5):510-4.
- Ernährung ÖAk. 2006. Empfehlungen für die parenterale und enterale Ernährungstherapie des Erwachsenen: Wilfried Druml, Klara Jadrna, Erich Roth.
- Esteban A, Anzueto A, Frutos F, Alia I, Brochard L, Stewart TE, Benito S, Epstein SK, Apezteguia C, Nightingale P et al. 2002. Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study. *Jama* 287(3):345-55.

- Fowler KH, McMurray DN, Fan YY, Aukema HM, Chapkin RS. 1993. Purified dietary n-3 polyunsaturated fatty acids alter diacylglycerol mass and molecular species composition in concanavalin A-stimulated murine splenocytes. *Biochim Biophys Acta* 1210(1):89-96.
- Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD. 1992. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 176(6):1665-71.
- Fritsche K. 2006. Fatty acids as modulators of the immune response. *Annu Rev Nutr* 26:45-73.
- Gadek JE, DeMichele SJ, Karlstad MD, Pacht ER, Donahoe M, Albertson TE, Van Hoozen C, Wennberg AK, Nelson JL, Noursalehi M. 1999. Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome. Enteral Nutrition in ARDS Study Group. *Crit Care Med* 27(8):1409-20.
- Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. 2000. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *Faseb J* 14(12):1749-53.
- Goggel R, Winoto-Morbach S, Vielhaber G, Imai Y, Lindner K, Brade L, Brade H, Ehlers S, Slutsky AS, Schutze S et al. 2004. PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med* 10(2):155-60.
- Goyert SM, Ferrero EM, Seremetis SV, Winchester RJ, Silver J, Mattison AC. 1986. Biochemistry and expression of myelomonocytic antigens. *J Immunol* 137(12):3909-14.
- Grimm H, Mertes N, Goeters C, Schlotzer E, Mayer K, Grimminger F, Furst P. 2006. Improved fatty acid and leukotriene pattern with a novel lipid emulsion in surgical patients. *Eur J Nutr* 45(1):55-60.
- Grimm H, Tibell A, Norrlind B, Blecher C, Wilker S, Schwemmler K. 1994. Immunoregulation by parenteral lipids: impact of the n-3 to n-6 fatty acid ratio. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 18(5):417-21.
- Grimminger F, Durr U, Seeger W. 1992. Ligand-operated synthesis of 4-series and 5-series leukotrienes in human neutrophils: critical dependence on exogenous free fatty acid supply. *Mol Pharmacol* 41(4):757-66.
- Grimminger F, Fuhrer D, Papavassilis C, Schlotzer E, Mayer K, Heuer KU, Kiss L, Walmrath D, Piberhofer S, Lubbecke F et al. 1993a. Influence of intravenous n-3 lipid supplementation on fatty acid profiles and lipid mediator generation in a patient with severe ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest* 23(11):706-15.

- Grimminger F, Mayer K, Kiss L, Walmrath D, Seeger W. 2000. PAF-induced synthesis of tetraenoic and pentaenoic leukotrienes in the isolated rabbit lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(2):L268-75.
- Grimminger F, Mayer K, Kramer HJ, Stevens J, Walmrath D, Seeger W. 1993b. Differential vasoconstrictor potencies of free fatty acids in the lung vasculature: 2-versus 3-series prostanoid generation. *J Pharmacol Exp Ther* 267(1):259-65.
- Grimminger F, Wahn H, Kramer HJ, Stevens J, Mayer K, Walmrath D, Seeger W. 1995. Differential influence of arachidonic vs. eicosapentaenoic acid on experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 268(6 Pt 2):H2252-9.
- Grimminger FW, H.; Seeger, Werner; Lasch, H. 1994. Granulozyten-Endothel-Interaktion; Mechanismen der Abwehr und Autoaggression. *Haemostaseologie* 14:7-15.
- Groeneveld AB. 2002. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Vascul Pharmacol* 39(4-5):247-56.
- Hamilton JA. 1998. Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res* 39(3):467-81.
- Han SJ, Ko HM, Choi JH, Seo KH, Lee HS, Choi EK, Choi IW, Lee HK, Im SY. 2002. Molecular mechanisms for lipopolysaccharide-induced biphasic activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *J Biol Chem* 277(47):44715-21.
- Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM. 1988. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol* 141(2):547-52.
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265(3):621-36.
- Held HD, Martin C, Uhlig S. 1999. Characterization of airway and vascular responses in murine lungs. *Br J Pharmacol* 126(5):1191-9.
- Heller A, Koch T, Schmeck J, van Ackern K. 1998. Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs* 55(4):487-96.
- Heller AR, Rossler S, Litz RJ, Stehr SN, Heller SC, Koch R, Koch T. 2006. Omega-3 fatty acids improve the diagnosis-related clinical outcome. *Crit Care Med* 34(4):972-9.
- Henson PM. 1970. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen. *J Exp Med* 131(2):287-306.

- Hermann C, Spreitzer I, Schroder NW, Morath S, Lehner MD, Fischer W, Schutt C, Schumann RR, Hartung T. 2002. Cytokine induction by purified lipoteichoic acids from various bacterial species--role of LBP, sCD14, CD14 and failure to induce IL-12 and subsequent IFN-gamma release. *Eur J Immunol* 32(2):541-51.
- Holtzman MJ. 1991. Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease. *Am Rev Respir Dis* 143(1):188-203.
- Ishii S, Kuwaki T, Nagase T, Maki K, Tashiro F, Sunaga S, Cao WH, Kume K, Fukuchi Y, Ikuta K et al. 1998. Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J Exp Med* 187(11):1779-88.
- Ishii S, Nagase T, Tashiro F, Ikuta K, Sato S, Waga I, Kume K, Miyazaki J, Shimizu T. 1997. Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. *Embo J* 16(1):133-42.
- Ishii S, Shimizu T. 2000. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* 39(1):41-82.
- Koller M, Senkal M, Kemen M, Konig W, Zumbobel V, Muhr G. 2003. Impact of omega-3 fatty acid enriched TPN on leukotriene synthesis by leukocytes after major surgery. *Clin Nutr* 22(1):59-64.
- Konstantopoulos K, McIntire LV. 1996. Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion. *J Clin Invest* 98(12):2661-5.
- Kramer HJ, Stevens J, Grimminger F, Seeger W. 1996. Fish oil fatty acids and human platelets: dose-dependent decrease in dienoic and increase in trienoic thromboxane generation. *Biochem Pharmacol* 52(8):1211-7.
- Lekka ME, Liokatis S, Nathanail C, Galani V, Nakos G. 2004. The impact of intravenous fat emulsion administration in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 169(5):638-44.
- Lo CJ, Chiu KC, Fu M, Lo R, Helton S. 1999. Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity. *J Surg Res* 82(2):216-21.
- Lorant DE, Patel KD, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. 1991. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J Cell Biol* 115(1):223-34.
- Lotvall J, Elwood W, Tokuyama K, Sakamoto T, Barnes PJ, Chung KF. 1992. A thromboxane mimetic, U-46619, produces plasma exudation in airways of the guinea pig. *J Appl Physiol* 72(6):2415-9.

- Lu Y, Hong S, Yang R, Uddin J, Gotlinger KH, Petasis NA, Serhan CN. 2007. Identification of endogenous resolvin E1 and other lipid mediators derived from eicosapentaenoic acid via electrospray low-energy tandem mass spectrometry: spectra and fragmentation mechanisms. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21(1):7-22.
- Luscinskas FW, Ding H, Tan P, Cumming D, Tedder TF, Gerritsen ME. 1996. L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow in vitro. *J Immunol* 157(1):326-35.
- Macclouf J, Murphy RC, Henson PM. 1989. Transcellular sulfidopeptide leukotriene biosynthetic capacity of vascular cells. *Blood* 74(2):703-7.
- Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, Hardy M, Gimenez JM, Chiang N, Serhan CN et al. 2003. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 278(44):43807-17.
- Mathiak G, Szewczyk D, Abdullah F, Ovadia P, Rabinovici R. 1997. Platelet-activating factor (PAF) in experimental and clinical sepsis. *Shock* 7(6):391-404.
- Mayer K, Fegbeutel C, Hattar K, Sibelius U, Kramer HJ, Heuer KU, Temmesfeld-Wollbruck B, Gokorsch S, Grimminger F, Seeger W. 2003a. Omega-3 vs. omega-6 lipid emulsions exert differential influence on neutrophils in septic shock patients: impact on plasma fatty acids and lipid mediator generation. *Intensive Care Med* 29(9):1472-81.
- Mayer K, Gokorsch S, Fegbeutel C, Hattar K, Rosseau S, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F. 2003b. Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 167(10):1321-8.
- Mayer K, Grimm H, Grimminger F, Seeger W. 2002a. Parenteral nutrition with n-3 lipids in sepsis. *Br J Nutr* 87 Suppl 1:S69-75.
- Mayer K, Merfels M, Muhly-Reinholz M, Gokorsch S, Rosseau S, Lohmeyer J, Schwarzer N, Krull M, Suttorp N, Grimminger F et al. 2002b. Omega-3 fatty acids suppress monocyte adhesion to human endothelial cells: role of endothelial PAF generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(2):H811-8.
- Mayer K, Meyer S, Reinholz-Muhly M, Maus U, Merfels M, Lohmeyer J, Grimminger F, Seeger W. 2003c. Short-time infusion of fish oil-based lipid emulsions, approved for parenteral nutrition, reduces monocyte proinflammatory cytokine generation and adhesive interaction with endothelium in humans. *J Immunol* 171(9):4837-43.

- Mohler KM, Sleath PR, Fitzner JN, Cerretti DP, Alderson M, Kerwar SS, Torrance DS, Otten-Evans C, Greenstreet T, Weerawarna K et al. 1994. Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature* 370(6486):218-20.
- Nagaoka J, Harada K, Kimura A, Kobayashi S, Murakami M, Yoshimura T, Yamada K, Asano O, Katayama K, Yamatsu I. 1991. Inhibitory effects of the novel platelet activating factor receptor antagonist, 1-ethyl-2-[N-(2-methoxy)benzoyl-N-[(2R)-2-methoxy-3-(4-octadecylcarbamoyloxy)piperidinocarbonyloxypropyloxy]carbonyl] aminomethyl-pyridinium chloride, in several experimentally induced shock models. *Arzneimittelforschung* 41(7):719-24.
- Nagase T, Ishii S, Kume K, Uozumi N, Izumi T, Ouchi Y, Shimizu T. 1999. Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice. *J Clin Invest* 104(8):1071-6.
- Nie ZG, Peng SY, Wang WJ. 2004. [Effects of ginkgolide B on lipopolysaccharide-induced TNF α production in mouse peritoneal macrophages and NF- κ B activation in rat pleural polymorphonuclear leukocytes]. *Yao Xue Xue Bao* 39(6):415-8.
- O'Dea KP, Young AJ, Yamamoto H, Robotham JL, Brennan FM, Takata M. 2005. Lung-marginated monocytes modulate pulmonary microvascular injury during early endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 172(9):1119-27.
- Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen JM, Leder P. 1994. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature* 370(6488):367-70.
- Ou-Yang XY, Wang WJ, Liao WH, Chen XH. 2005. [Inhibitory effect of ginkgolide B on angiogenesis in chronic inflammation]. *Yao Xue Xue Bao* 40(4):311-5.
- Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. 2002. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol* 169(11):6498-506.
- Pacht ER, DeMichele SJ, Nelson JL, Hart J, Wennberg AK, Gadek JE. 2003. Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants reduces alveolar inflammatory mediators and protein influx in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 31(2):491-500.
- Palluy O, Morliere L, Gris JC, Bonne C, Modat G. 1992. Hypoxia/reoxygenation stimulates endothelium to promote neutrophil adhesion. *Free Radic Biol Med* 13(1):21-30.
- Parker JC, Townsley MI. 2004. Evaluation of lung injury in rats and mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(2):L231-46.

- Parker P, Taylor. 1984. Permeability of the microvascular barrier. *Edema*:143-187.
- Patarroyo M. 1994. Adhesion molecules mediating recruitment of monocytes to inflamed tissue. *Immunobiology* 191(4-5):474-7.
- Pellegrini JD, Puyana JC, Lapchak PH, Kodys K, Miller-Graziano CL. 1996. A membrane TNF-alpha/TNFR ratio correlates to MODS score and mortality. *Shock* 6(6):389-96.
- Peng SY, Zhang FY, Ou-Yang XY, Liu Y, Wang WJ. 2006. Effect of ginkgolide B on the platelet-activating factor induced changes of chemotaxis and cytoskeleton of macrophages. *Yao Xue Xue Bao* 41(2):156-60.
- Peterson J, Bihain BE, Bengtsson-Olivecrona G, Deckelbaum RJ, Carpentier YA, Olivecrona T. 1990. Fatty acid control of lipoprotein lipase: a link between energy metabolism and lipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(3):909-13.
- Pontes-Arruda A, Aragao AM, Albuquerque JD. 2006. Effects of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in mechanically ventilated patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 34(9):2325-33.
- Poveshchenko AF, Kozlov VA. 1999. [The effect of platelet-activating factor and its antagonist--BN 52021--on immune reactions in vivo in mice and in vitro]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*(4):53-6.
- Poynter ME, Irvin CG, Janssen-Heininger YM. 2003. A prominent role for airway epithelial NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation. *J Immunol* 170(12):6257-65.
- Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. 1984. Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(11):3534-8.
- Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. 1990. Platelet-activating factor. *J Biol Chem* 265(29):17381-4.
- Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. 2000. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 69:419-45.
- Rotundo RF, Curtis TM, Shah MD, Gao B, Mastrangelo A, LaFlamme SE, Saba TM. 2002. TNF-alpha disruption of lung endothelial integrity: reduced integrin mediated adhesion to fibronectin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282(2):L316-29.
- Santoli D, Zurier RB. 1989. Prostaglandin E precursor fatty acids inhibit human IL-2 production by a prostaglandin E-independent mechanism. *J Immunol* 143(4):1303-9.

- Sardesai VM. 1992. The essential fatty acids. *Nutr Clin Pract* 7(4):179-86.
- Schaefer MB, Ott J, Mohr A, Bi MH, Grosz A, Weissmann N, Ishii S, Grimminger F, Seeger W, Mayer K. 2007. Immunomodulation by n-3- versus n-6-rich lipid emulsions in murine acute lung injury--role of platelet-activating factor receptor. *Crit Care Med* 35(2):544-54.
- Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. 1999. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 112 (Pt 1):137-46.
- Schumann RR. 1992. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Res Immunol* 143(1):11-5.
- Schumann RR, Lamping N, Kirschning C, Knopf HP, Hoess A, Herrmann F. 1994. Lipopolysaccharide binding protein: its role and therapeutical potential in inflammation and sepsis. *Biochem Soc Trans* 22(1):80-2.
- Seeger W, Bauer M, Bhakdi S. 1984. Staphylococcal alpha-toxin elicits hypertension in isolated rabbit lungs. Evidence for thromboxane formation and the role of extracellular calcium. *J Clin Invest* 74(3):849-58.
- Seeger W, Lasch HG. 1987. Septic lung. *Rev Infect Dis* 9 Suppl 5:S570-9.
- Seeger W, Obernitz R, Thomas M, Walmrath D, Suttorn N, Holland IB, Grimminger F, Eberspacher B, Hugo F, Bhakdi S. 1991. Lung vascular injury after administration of viable hemolysin-forming *Escherichia coli* in isolated rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* 143(4 Pt 1):797-805.
- Seeger W, Suttorp N. 1987. Role of membrane lipids in the pulmonary vascular abnormalities caused by bacterial toxins. *Am Rev Respir Dis* 136(2):462-6.
- Serhan CN. 2005. Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8(2):115-21.
- Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL. 2002. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 196(8):1025-37.
- Shong M, Ro HK, Kim YK, Yoo CJ, Lee JH, Song CU, Cho BY. 1994. The cytokines, interleukin-1 beta, interleukin-6 and interferon-gamma upregulate the expression of intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) in rat thyroid cell line, FRTL-5. *Korean J Intern Med* 9(2):88-92.

- Singer P, Theilla M, Fisher H, Gibstein L, Grozovski E, Cohen J. 2006. Benefit of an enteral diet enriched with eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid in ventilated patients with acute lung injury. *Crit Care Med* 34(4):1033-8.
- Soares AC, Pinho VS, Souza DG, Shimizu T, Ishii S, Nicoli JR, Teixeira MM. 2002. Role of the platelet-activating factor (PAF) receptor during pulmonary infection with gram negative bacteria. *Br J Pharmacol* 137(5):621-8.
- Sperling RI, Benincaso AI, Knoell CT, Larkin JK, Austen KF, Robinson DR. 1993. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J Clin Invest* 91(2):651-60.
- Steinmetz HT, Herbertz A, Bertram M, Diehl V. 1995. Increase in interleukin-6 serum level preceding fever in granulocytopenia and correlation with death from sepsis. *J Infect Dis* 171(1):225-8.
- Suchner U, Katz DP, Furst P, Beck K, Felbinger TW, Senftleben U, Thiel M, Goetz AE, Peter K. 2001. Effects of intravenous fat emulsions on lung function in patients with acute respiratory distress syndrome or sepsis. *Crit Care Med* 29(8):1569-74.
- Svensjo E, Grega GJ. 1986. Evidence for endothelial cell-mediated regulation of macromolecular permeability by postcapillary venules. *Fed Proc* 45(2):89-95.
- Szarka RJ, Wang N, Gordon L, Nation PN, Smith RH. 1997. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. *J Immunol Methods* 202(1):49-57.
- Taylor NM, Lacoumenta S, Hall GM. 1997. Fentanyl and the interleukin-6 response to surgery. *Anaesthesia* 52(2):112-5.
- Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. 1995. The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J* 9(10):866-73.
- Terashita Z, Kawamura M, Takatani M, Tsushima S, Imura Y, Nishikawa K. 1992. Beneficial effects of TCV-309, a novel potent and selective platelet activating factor antagonist in endotoxin and anaphylactic shock in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 260(2):748-55.
- Tessner TG, O'Flaherty JT, Wykle RL. 1989. Stimulation of platelet-activating factor synthesis by a nonmetabolizable bioactive analog of platelet-activating factor and influence of arachidonic acid metabolites. *J Biol Chem* 264(9):4794-9.
- Thivierge M, Parent JL, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. 1996. Modulation of human platelet-activating factor receptor gene expression by protein kinase C activation. *J Immunol* 157(10):4681-7.

- Tonks AJ, Tonks A, Morris RH, Jones KP, Jackson SK. 2003. Regulation of platelet-activating factor synthesis in human monocytes by dipalmitoyl phosphatidylcholine. *J Leukoc Biol* 74(1):95-101.
- Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, Meersseman W, Wouters PJ, Milants I, Van Wijngaerden E, Bobbaers H, Bouillon R. 2006. Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N Engl J Med* 354(5):449-61.
- Van Ostade X, Tavernier J, Fiers W. 1994. Structure-activity studies of human tumour necrosis factors. *Protein Eng* 7(1):5-22.
- Verbrugge SJ, Sorm V, Lachmann B. 1997. Mechanisms of acute respiratory distress syndrome: role of surfactant changes and mechanical ventilation. *J Physiol Pharmacol* 48(4):537-57.
- Vincent JL, Bihari D. 1992. Sepsis, severe sepsis or sepsis syndrome: need for clarification. *Intensive Care Med* 18(5):255-7.
- Walmrath D, Ghofrani HA, Grimminger F, Seeger W. 1996. Synergism of alveolar endotoxin "priming" and intravascular exotoxin challenge in lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 154(2 Pt 1):460-8.
- Walmrath D, Scharmann M, König R, Pilch J, Grimminger F, Seeger W. 1993. Staphylococcal alpha-toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated blood-free perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* 74(4):1972-80.
- Weber C, Erl W, Pietsch A, Danesch U, Weber PC. 1995. Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(5):622-8.
- Weissmann N, Manz D, Buchspsies D, Keller S, Mehling T, Voswinckel R, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Fink L et al. 2005. Congenital erythropoietin over-expression causes "anti-pulmonary hypertensive" structural and functional changes in mice, both in normoxia and hypoxia. *Thromb Haemost* 94(3):630-8.
- Weller PF, Lee CW, Foster DW, Corey EJ, Austen KF, Lewis RA. 1983. Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: predominant production of leukotriene C4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(24):7626-30.
- Weyrich AS, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. 1995. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J Clin Invest* 95(5):2297-303.

- Wichmann MW, Thul P, Czarnetzki HD, Morlion BJ, Kemen M, Jauch KW. 2007. Evaluation of clinical safety and beneficial effects of a fish oil containing lipid emulsion (Lipoplus, MLF541): data from a prospective, randomized, multicenter trial. *Crit Care Med* 35(3):700-6.
- Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt RW, Cerami A. 1989. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(2):612-6.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249(4975):1431-3.
- Yamagishi J, Kawashima H, Matsuo N, Ohue M, Yamayoshi M, Fukui T, Kotani H, Furuta R, Nakano K, Yamada M. 1990. Mutational analysis of structure--activity relationships in human tumor necrosis factor- α . *Protein Eng* 3(8):713-9.
- Yang P, Chan D, Felix E, Cartwright C, Menter DG, Madden T, Klein RD, Fischer SM, Newman RA. 2004. Formation and antiproliferative effect of prostaglandin E(3) from eicosapentaenoic acid in human lung cancer cells. *J Lipid Res* 45(6):1030-9.
- Yipp BG, Andonegui G, Howlett CJ, Robbins SM, Hartung T, Ho M, Kubes P. 2002. Profound differences in leukocyte-endothelial cell responses to lipopolysaccharide versus lipoteichoic acid. *J Immunol* 168(9):4650-8.
- Zhou Z, Kozlowski J, Schuster DP. 2005. Physiologic, biochemical, and imaging characterization of acute lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 172(3):344-51.
- Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. 1997. Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions. *J Clin Invest* 100(11 Suppl):S3-5.
- Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. 1996. Platelet-activating factor: antagonists, terminators, molecular mimics, and microbial opportunism. *J Intern Med* 239(6):463-6.
- Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. 2002. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* 30(5 Suppl):S294-301.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Signalweg des Lipopolysaccharides.....	12
Abbildung 2:	Rollen, Adhäsion und Transmigration der Leukozyten.....	14
Abbildung 3:	Einfluss der Adhäsionsmoleküle auf Rollen, Adhäsion und Transmigration der Leukozyten	16
Abbildung 4:	Strukturformel Arachidonsäure.....	22
Abbildung 5:	Eicosapentaensäure.....	24
Abbildung 6:	Docosahexaensäure.....	24
Abbildung 7:	Chemische Struktur des PAF.....	28
Abbildung 8:	Synthese und Abbau des PAF.....	30
Abbildung 9:	Struktur des PAF-Rezeptors.....	32
Abbildung 10:	Signaltransduktionsweg des PAF-Rezeptors.....	34
Abbildung 11:	Chemische Strukturformel des Ginkgolide B.....	36
Abbildung 12:	Fettsäure-Umbau und –Synthese.....	39
Abbildung 13:	Inhaltszusammensetzung der verwendeten Lipidemulsionen.....	40
Abbildung 14:	Venen-Katheter für die OP.....	49
Abbildung 15:	Präparation der V. jugularis und umschlingen mit Faden.....	50
Abbildung 16:	Überprüfung der Lage des Katheters.....	51
Abbildung 17:	eine fertig operierte Maus mit auf dem Rücken befindlicher 28d- Pumpe.....	52
Abbildung 18:	Aufbau einer ALZET osmotischen Pumpe.....	53
Abbildung 19:	Zeitverlauf bei den Versuchen.....	60
Abbildung 20:	Leukozytenanzahl in der BAL bei WT-Tieren nach Stimulation der Lunge mit 1 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden.....	63
Abbildung 21:	Leukozytenanzahl in der BAL bei WT-Tieren nach Stimulation der Lunge mit 10 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden.....	64
Abbildung 22:	Transmigration der Leukozyten in den Alveolarraum im Zeitverlauf.....	65
Abbildung 23:	Differenzierung der Leukozyten aus der BAL bei unstimulierten Tieren.....	66
Abbildung 24:	Differenzierung der Leukozyten aus der BAL bei Tieren, die mit 1 µg LPS intratracheal stimuliert wurden.....	67
Abbildung 25:	Leukozytenanzahl in der BAL bei PAF-R-KO-Tieren nach Stimulation der Lunge mit 1 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden.....	68
Abbildung 26:	Leukozytenanzahl in der BAL bei PAF-R-KO-Tieren nach Stimulation der Lunge mit 10 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden.....	69
Abbildung 27:	Leukozytenanzahl in der BAL bei PAF-RA-Tieren infolge Stimulation der Lunge mit 1 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden.....	70
Abbildung 28:	Leukozytenanzahl in der BAL bei PAF-RA-Tieren nach Stimulation der Lunge mit 10 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden.....	71
Abbildung 29:	Leukozytenanzahl in der BAL bei unterschiedlichen Mauslinien im Vergleich.....	72
Abbildung 30:	MPO-Aktivität im Lungengewebe bei WT-Tieren nach Stimulation der Lunge mit 10 µg LPS i.t.....	73
Abbildung 31:	MPO-Aktivität im Lungengewebe bei WT-Tieren nach Stimulation der Lunge mit 1 µg LPS i.t.....	74

Abbildung 32: Aktivität der MPO bei PAF-R-KO-Mäusen, die mit 10 µg LPS i.t. stimuliert wurden	75
Abbildung 33: MPO-Aktivität bei PAF-RA-Mäusen, die mit 10 µg LPS i.t. stimuliert wurden.....	76
Abbildung 34: Werte der MPO-Aktivität bei den verschiedenen Mauslinien im Vergleich.....	77
Abbildung 35: Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut bei WT.....	78
Abbildung 36: Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut bei PAF-R-KO.....	79
Abbildung 37: Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut bei PAF-RA.....	80
Abbildung 38: Proteinkonzentration in BAL bei 1 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden bei WT-Mäusen.....	82
Abbildung 39: Proteinkonzentration in BAL bei 10 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden bei WT-Mäusen.....	83
Abbildung 40: Proteinkonzentration in BAL bei 10 µg LPS i.t., Vergleich der unterschiedlichen Lavage-Zeitpunkten bei WT-Mäusen.....	84
Abbildung 41: Proteinkonzentration in BAL bei 1 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden bei PAF-R-KO-Mäusen.....	85
Abbildung 42: Proteinkonzentration in der BAL bei 10 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden bei PAF-R-KO-Mäusen.....	86
Abbildung 43: Proteinkonzentration in BAL bei 1 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden bei PAF-RA-Mäusen.....	87
Abbildung 44: Proteinkonzentration in BAL bei 10 µg LPS i.t., BAL nach 24 Stunden bei PAF-RA-Mäusen.....	88
Abbildung 45: Proteinkonzentration in der BAL im Vergleich.....	89
Abbildung 46: TNF-α Konzentration bei WT-Mäusen bei 1 µg LPS, BAL nach 24 Stunden.....	91
Abbildung 47: TNF-α-Konzentration bei WT-Mäusen bei 10 µg LPS, BAL nach 24 Stunden.....	92
Abbildung 48: Konzentration des Zytokins TNF-α im Zeitverlauf bei WT-Mäusen bei 10 µg LPS i.t.....	93
Abbildung 49: MIP-2-Konzentration bei WT-Mäusen bei 1 µg LPS, BAL nach 24 Stunden.....	94
Abbildung 50: MIP-2 Konzentration bei WT-Mäusen bei 10 µg LPS, BAL nach 24 Stunden.....	95
Abbildung 51: Konzentration des Zytokins MIP-2 im Zeitverlauf bei WT-Mäusen bei 10 µg LPS i.t.....	96
Abbildung 52: TNF-α-Konzentration bei PAF-R-KO- Mäusen bei 1 µg LPS, BAL nach 24 Stunden.....	97
Abbildung 53: TNF-α-Konzentration bei PAF-R-KO- Mäusen bei 10 µg LPS, BAL nach 24 Stunden.....	98
Abbildung 54: MIP-2 Konzentration bei PAF-R-KO-Mäusen bei 1 µg LPS, BAL nach 24 Stunden.....	99
Abbildung 55: MIP-2 Konzentration bei PAF-R-KO-Mäusen bei 10 µg LPS, BAL nach 24 Stunden.....	100
Abbildung 56: TNF-α-Konzentration bei PAF-RA-Mäusen bei 1 µg LPS, BAL nach 24 Stunden.....	101
Abbildung 57: TNF-α-Konzentration bei PAF-RA-Mäusen bei 10 µg LPS, BAL nach 24 Stunden.....	102

Abbildung 58: Konzentrationswerte des Zytokins TNF- α bei den verschiedenen Mauslinien im Vergleich.....	103
Abbildung 59: MIP-2 Konzentration bei PAF-RA-Mäusen bei 1 μ g LPS, BAL nach 24 Stunden.....	104
Abbildung 60: MIP-2 Konzentration bei PAF-RA-Mäusen bei 10 μ g LPS, BAL nach 24 Stunden.....	105
Abbildung 61: Konzentrationswerte des Zytokins MIP-2 bei den verschiedenen Mauslinien im Vergleich.....	106

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger, Herrn Prof. Dr. Werner Seeger, Herrn PD Dr. Konstantin Mayer und Frau Dr. Martina Schaefer für die Ermöglichung dieser Arbeit. Darüber hinaus danke ich Herrn PD Dr. K. Mayer und Frau Dr. M. Schaefer ganz besonders für die freundliche und intensive Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit. Deren Hilfe bei der Bewältigung anstehender Probleme hat sehr beim Anfertigen dieser Arbeit geholfen.

Herrn Prof. Dr. Martin Diener für die freundliche und unkomplizierte Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin und für die Begutachtung dieser Dissertation.

Meinen Arbeitskollegen Andrea Mohr, Dr. Bi Ming Hua, Andrea Pose, Juliane Mest, Alice Wenzel, Tobias Fischer und Almuth Kiessling, die mir während dieser Zeit sehr geholfen haben und hilfsbereit zur Seite standen.

Im Folgenden möchte ich mich noch bei diesen Personen bedanken, die mir auf ihre Art und Weise sehr geholfen haben: Dr. Katrin Ahlbrecht, Gudrun und Manfred Dörfler, Dr. HaJo Krämer, Tim Kuchenbuch, PD Dr. Ulrich Maus, PD Dr. Thomas Noll, Dr. Bastian Ott, Dr. Mirko Steinmüller, Dr. Anne Textor, Martina Willebrand, Karin Quanz und bei den Damen des Labors Prof. Dr. Lohmeyer und des hämatologischen Labors.

Danken möchte ich auch von Herzen meinen Eltern Ulrike und Dr. Hans-Friedrich Ott, die mir mein Studium und diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

10 Erklärung

Nach § 10, Absatz 5 der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen vom 6. Februar 2002 erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche Auskünfte beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5373-7



9 17 8 3 8 3 5 11 9 5 3 7 3 4